

# **Verunreinigung mit Zelltrümmern und Lipopolysacchariden beschleunigt nicht die immunologische Abstoßung von Inseltransplantaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Yvonne Sabrina Simonis

aus Wiesbaden

Giessen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Leiter: Prof. Dr. Reinhard G. Bretzel

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer und Gutachter: PD Dr. Henning Jahr

Gutachter: Prof. Dr. Gregor Bein

Tag der Disputation: 11. Juni 2002





Für Josh,  
für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
Diabetes mellitus .....	8
Therapieoptionen .....	9
Orale Therapie .....	9
Substitution mit exogenem Insulin .....	10
Ersatz des Inselapparates .....	10
Pankreas- und Inseltransplantation .....	11
Experimentelle Pankreas- und Inseltransplantation .....	11
Klinische Transplantation des Pankreas .....	11
Klinische Inseltransplantation .....	12
Mögliche Ursachen für eine beeinträchtigte Funktion von Inseltransplantaten .....	13
Grundlagen der Transplantationsimmunologie .....	14
Wiederkehrende Autoimmunität bei transplantierten Typ I-Diabetikern .....	15
Heutige Therapie der immunologischen Abstoßung von Inseltransplantaten .....	16
Die "Alarmtheorie" .....	17
Schädigung von Inseln durch inflammatorische Prozesse .....	18
Schädigung von Inseln durch LPS .....	18
Transplantaterkennung durch das Immunsystem .....	19
Vermutete Wirkung von Alarmsignalen bei der Abstoßung von Transplantaten .....	22
Vermutete Rolle von LPS als Alarmsignal bei der Abstoßung von Inseltransplantaten .....	24
<b>Fragestellungen .....</b>	<b>25</b>
Versuche zur Beantwortung der Fragestellungen .....	26
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
Kulturmedium .....	27
Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) .....	27
Tiere .....	29
In-vitro-Untersuchungen mit Ratteninseln .....	30

Isolation .....	30
Viabilitätstests .....	33
Inselfunktionstests .....	34
In-vivo-Versuche: Inseltransplantation.....	36
Auswertung der Messergebnisse .....	38
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
Nachweis der Aktivität der verwendeten Endotoxin-Charge .....	39
Endotoxingehalt von Isolations- und Kulturmedien .....	40
LPS-Gehalt kultivierter Langerhans-Inseln .....	40
In-vitro-Versuche mit kultivierten Langerhans-Inseln .....	41
Viabilität im Annexin- und Trypanblautest .....	41
Inselfunktion kultivierter Langerhans-Inseln .....	42
In-vivo-Versuche: Transplantation kultivierter Langerhans-Inseln .....	44
Blutglucosemonitoring .....	44
Überlebenszeiten der Transplantate .....	45
<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
Kein Einfluss von Zelltrümmern und LPS-Kontamination auf die Abstoßung von Inseltransplantaten .....	47
Interpretation der Ergebnisse .....	48
Praktische Konsequenzen .....	51
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>

# Einleitung

## *Diabetes mellitus*

Der Begriff Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von Kohlenhydratstoffwechselstörungen, die mit einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin einhergehen. Die Prävalenz des Diabetes mellitus beträgt in Deutschland etwa 4% (Hauner *et al.* 1996). Typisches Krankheitsbild ist die Hyperglykämie mit Polydipsie, Polyurie, Glucosurie und Leistungsknick. Untherapiert führt absoluter Insulinmangel zur hyperglykämischen Stoffwechselentgleisung mit lebensbedrohlichem ketoazidotischem Koma.

Die Administration exogenen Insulins hat bei Diabetikern die Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten deutlich erhöht. Die längere Krankheitsdauer geht jedoch einher mit einer hohen Rate an diabetischen Spätkomplikationen; Makro- und Mikroangiopathie führen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität, die Zahl der Todesfälle bei Typ I-Diabetikern bis zum 50. Lebensjahr ist fünfmal höher als bei Stoffwechselgesunden (Drucksache 12/4368 des Deutschen Bundestages, 1993).

Eine schlechte Einstellung des Blutzuckers erhöht das Risiko, an Spätkomplikationen zu erkranken. Darunter fallen z.B. Nierenversagen, koronare Herzkrankheit, Herztod, Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Gangrän, Erblindung, reduzierte Immunkompetenz mit schweren und rezidivierenden Infektionen, gestörter Fettstoffwechsel und Leberschäden. Langzeitmarker für den Verlauf der Blutglucosewerte über Wochen ist das glykosilierte Hämoglobin (HbA<sub>1C</sub>). Bei erfolgreicher Stoffwechseleinstellung liegt das HbA<sub>1C</sub> bei Werten <6,5%.

Diabetes mellitus wird in Typ I und II unterteilt. Beim Typ I handelt es sich um eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung: Polyvalente Vererbung und bisher nicht geklärte Umweltfaktoren (möglicherweise infektiöse Prozesse) lösen eine immunologische Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas aus. Es sind regelmäßig Antikörper gegen Proteine der Inselzellen (z.B. Insulin, GAD, HSP60) vorhanden. Das histologische Bild zeigt eine zelluläre Insulitis (Makrophagen, dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten). Offenbar vermitteln spezifische T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) die Entzündung (Tisch und McDevitt,



## Einleitung

---

1996; Benoist und Mathis, 1997). Denkbar ist auch eine unspezifische Schädigung der empfindlichen  $\beta$ -Zellen durch NO, Sauerstoffradikale und Zytokine aus Makrophagen, aktivierten T-Zellen und Endothelzellen (Kolb *et al.* 1995).

Durch Zerstörung der  $\beta$ -Zellen kommt es zum absoluten Insulinmangel, der substituiert werden muss. Diabetes Mellitus Typ I wird deshalb auch als insulinabhängiger Diabetes (IDDM, Insulin Dependend Diabetes Mellitus) bezeichnet. Typ I manifestiert sich vorwiegend bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen.

Typ II Diabetes (NIDDM, Non Insulin Dependend Diabetes mellitus), der häufig im fortgeschrittenen Erwachsenenalter in Kombination mit Übergewicht auftritt, ist durch relativen Insulinmangel gekennzeichnet. Hier trifft periphere Insulinresistenz (Zielzelldefekt) auf eine inadäquate kompensatorische Insulinsekretion, es besteht trotz Hyperinsulinismus ein Zustand der Hyperglykämie. Erst sekundär stellt sich ein Erschöpfungszustand mit Insulinmangel ein.

## ***Therapieoptionen***

Die Therapie des Diabetes mellitus zielt darauf, den Stoffwechsel zu normalisieren, gefährliche hyper- und hypoglykämische Entgleisungen zu vermeiden sowie Spätkomplikationen zu verhindern oder ihren Eintritt hinauszuzögern. Die Nebenwirkungen und Begleitumstände der Therapie sollten die Lebensqualität des Patienten nicht einschränken.

### **Orale Therapie**

Der Typ II-Diabetiker ist von exogener Insulinzufuhr primär unabhängig. Der Schlüssel zur Therapie ist hier die Gewichtsnormalisierung, z.B. durch Diät und körperliche Aktivität. Als zusätzliche Therapieoptionen kommen Medikamente in Frage, welche die Glucoseresorption verzögern (Glucosidase-Inhibitoren), Glucoseverwertung verbessern (Biguanide), die Insulinsekretion erhöhen (Sulfonylharnstoffe) oder die Insulinresistenz in der Zelle durchbrechen (Glitazone). Sind die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen beim Typ II-Diabetiker durch jahrelange Hypersekretion erschöpft, muss Insulin substituiert werden.

### Substitution mit exogenem Insulin

Beim Typ I-Diabetiker sind die pankreatischen  $\beta$ -Zellen zerstört, die Substitution mit Insulin ist unerlässlich. Durch die Vielfalt der Eigenschaften der unterschiedlichen Insulinpräparate (z.B. verzögert und schnellwirksame Insuline, Mischinsuline) wird eine an den Bedarf angepasste Substitution mit gleichmäßigem Blutglucosespiegel prinzipiell ermöglicht. Eine konventionelle Therapie (1-2 Insulininjektionen pro Tag) ist allerdings unzureichend und kann Spätkomplikationen nicht verhindern. Prospektive Langzeitstudien (DCCT, 1993) zeigten, dass Auftreten und Progression lebensbedrohlicher diabetischer Spätkomplikationen durch Patientenschulung, engmaschige Kontrolle und straffe Einstellung des Blutzuckers durch eine intensivierete Insulintherapie (drei oder mehr Injektionen täglich, gestützt durch regelmäßige Blutzuckerbestimmungen) signifikant gesenkt werden können. Das therapeutische Fenster zwischen suffizienter Senkung des HbA<sub>1c</sub> und gesteigertem Hypoglykämierisiko ist allerdings eng: Intensivierte Insulintherapie führt zwei- bis dreimal häufiger zu behandlungspflichtigen hypoglykämischen Entgleisungen als konventionelle Insulintherapie. Die Lebensqualität des Diabetikers wird durch häufiges Blutzuckermessen, Spritzen von Insulin und Einhalten einer Diät beeinträchtigt. Die Anwendung der intensivierten Insulintherapie setzt intellektuelle Eigenleistung, Motivation und Compliance voraus.

Die Insulintherapie kann mit Hilfe von subcutaner Insulininfusion komfortabler gestaltet werden. Hier wird ein Basisbedarf an Insulin kontinuierlich über einen implantierten Katheter appliziert, zusätzlich können je nach Nahrungsaufnahme Boli flexibel dazugegeben werden. Diese Insulinpumpen sind bislang nicht in der Lage, den aktuellen Blutzuckerspiegel zu erkennen und von sich aus zu regulieren, also kommt es auch unter ihrer Anwendung häufig zu bedrohlichen Hypoglykämien. Solange implantierbare und langfristig funktionsfähige Sensoren zur kontinuierlichen Glucosemessung noch nicht zur Verfügung stehen, besteht bei Anwendung der Insulinpumpe die Notwendigkeit zur mehrmals täglichen Blutzuckerselbstkontrolle. Da die Insulinausschüttung aus  $\beta$ -Zellen auch von Aminosäuren, Enterohormonen und nervalen Reizen geregelt wird, ist die Insulinpumpentherapie noch weit davon entfernt, ein vollwertiger Ersatz des zerstörten Inselgewebes zu sein.

### Ersatz des Inselapparates

Strikte glykämische Kontrolle ohne Gefahr der Hypoglykämie und ohne Applikation exogenen Insulines lässt sich bei Typ I-Diabetikern bisher einzig durch biologischen Ersatz

## Einleitung

---

des erkrankten Inselgewebes erreichen (Sutherland *et al.* 1993; Bretzel *et al.* 1993). Dies kann entweder über Pankreas-/Pankreasteiltransplantation oder Transplantation isolierter Langerhans-Inseln aus Spenderpankreas geschehen.

## ***Pankreas- und Inseltransplantation***

### **Experimentelle Pankreas- und Inseltransplantation**

Im Tierversuch zeigten sich positive Auswirkungen der Pankreasorgantransplantation: Sie führte an Nagern zur Reversion der diabetischen Stoffwechsellage und verhinderte das Auftreten von Spätkomplikationen (Lacy, 1993).

Auch die Inseltransplantation wurde in zahlreichen Experimenten am Tiermodell (Nager, Hunde, Primaten) erfolgreich durchgeführt. Plasmainsulin und Blutglucosespiegel normalisierten sich nach Transplantation, HbA<sub>1c</sub> wurde auf Normalwerte gesenkt, Polyurie und Glucosurie verschwanden. Längerfristig wurden Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie, Kardiopathie und Störungen im Knochenstoffwechsel vermieden, verzögert oder gebessert (Federlin und Bretzel, 1984; Bretzel *et al.* 1992). Positive Effekte der Inseltransplantation zeigten sich besonders dann, wenn die Inseltransplantation nicht zu lange nach dem Zeitpunkt der Induktion des Diabetes mellitus erfolgte.

### **Klinische Transplantation des Pankreas**

Die erste Pankreastransplantation wurde 1966 durchgeführt. Bis 1999 wurden 12.930 Patienten mit Pankreastransplantaten versorgt (Bland, IPTR Newsletter 2000).

Das Pankreas wird aus hirntoten Multiorganspendern entnommen und in die Bauchhöhle des Empfängers transplantiert. Die endokrine Drainage erfolgt venös-portal über eine Mesenterialvene, bei schlechten Gefäßverhältnissen auch venös-systemisch über die V. Iliaca. Bei der Pankreastransplantation wird neben den erwünschten Inseln viel exokrines Gewebe übertragen, dessen aggressive proteolytische Verdauungssäfte in die Harnblase oder den Darm (über ein Duodenalsegment oder Y-Roux-Schlinge) entsorgt werden.

## Einleitung

---

Die Pankreastransplantation führt zur glykämischen Kontrolle. Sie war bisher das einzige Verfahren, mit dem sicher Euglykämie und Insulinunabhängigkeit erreicht werden konnte. Studien geben Hinweise darauf, dass durch Pankreastransplantation eine dauerhafte Kontrolle des Diabetes erreicht, das Fortschreiten der diabetischen Komplikationen verhindert und die Lebensqualität des Patienten gesteigert werden kann (American Diabetes Association, 1996). Nach einem Jahr funktionieren noch 85% der transplantierten Pankreata (Bland, IPTR Newsletter 2000).

Zur Pankreastransplantation ist ein großer operativer Eingriff nötig. 30% der pankreastransplantierten Patienten erfahren anschließend Komplikationen, die zu verlängerter Hospitalisierung führen (Morris 1997), z.B. Blutungen, lokale Infektionen, Nahtinsuffizienz und Transplantatpankreatitis. Bei durch fortgeschrittene Mikro- und Makroangiopathie kardial vorgeschädigten diabetischen Patienten muss ein erhöhtes Narkoserisiko erwartet werden. Wird das Transplantat zerstört, z.B. durch Thrombose, akute Abstoßung oder Pankreatitis, ist eine Relaparatomie notwendig.

## Klinische Inseltransplantation

Historische Versuche der Inseltransplantation gehen bis ins Jahr 1893 zurück. Im Zeitraum von 1990 bis Dezember 2000 wurden 394 Patienten mit allogenen Langerhans-Inseln transplantiert (Brendel *et al.* 2001).

Die Langerhans-Inseln werden aus Pankreata toter Multiorganspender gewonnen. Die Inselisolation erfolgt mit automatisierten Digestions-Filtrations-Verfahren durch enzymatische Lösung der Zellverbände und anschließende Reinigung des endokrinen Gewebes auf Gradienten (Ricordi *et al.* 1988; Brandhorst *et al.* 1998). Die Inseln werden in den linken Leberlappen des Empfängers transplantiert. CT-gesteuert wird die Portalvene punktiert, das Gewebe wird durch einen feinen Katheter übertragen. Der Eingriff wird gut vertragen, nur sehr selten kommt es zu Komplikationen.

Die Inseltransplantation hat entscheidende Vorteile gegenüber der Pankreastransplantation: Nur das „erwünschte“ endokrine Gewebe wird transplantiert, die Entsorgung der exokrinen Sekrete entfällt also. Durch die geringe Gewebsmenge und die mikroskopische Größe der Inseln kann ein minimal invasiver Eingriff in Lokalanästhesie erfolgen.

## Einleitung

---

Werden transplantierte Inseln immunologisch zerstört, beeinträchtigt die geringe abgestoßene Gewebsmenge den Organismus nicht.

Der Erfolg der autologen Inseltransplantation bei Patienten nach Pankreatektomie zeigt, dass die Methoden der Inselgewinnung, Aufbereitung und Transplantation prinzipiell erfolgreich sind. Hier wurden nach zwei Jahren bis zu 74% der transplantierten Patienten Unabhängigkeit von exogen appliziertem Insulin beobachtet. Barrieren wie Alloreaktivität oder Autoimmunität bestanden nicht (Wahoff *et al.* 1995).

Lediglich 1/10 der mit allogenen Inseln transplantierten Typ I-Diabetiker wurde bisher von der Zufuhr exogenen Insulins unabhängig, etwa 60% der Transplantate verloren ihre Funktion innerhalb eines Jahres (Hering, Ricordi, 1999; Brendel, ITR Newsletter, 2001).

Diejenigen Patienten, die nicht insulinfrei wurden, aber nach Transplantation normalisierte basale C-Peptid-Sekretion aufwiesen, profitierten von einer verbesserten glykämischen Regulation (Meyer *et al.* 1998; Luzi *et al.* 2001). HbA<sub>1c</sub>-Level sanken, es traten deutlich weniger hypoglykämische Episoden pro Jahr auf, nicht zuletzt konnte die zugeführte exogene Insulinmenge drastisch reduziert werden (Bretzel und Ricordi, 1997; Hering und Ricordi, 1999). Wegen der ungelösten Problematik der Abstoßung von Transplantaten und der Nebenwirkungen der dagegen verabreichten immunsuppressiven Medikation war die Versorgung der eigentlichen Zielgruppe dieser Therapie (junge Patienten mit kürzlich aufgetretenem Typ I-Diabetes) zur Prävention von diabetischen Spätkomplikationen und kurativen Normalisierung des Stoffwechsels bislang nicht möglich. Insulinunabhängigkeit sofort nach allogener Inseltransplantation wurde jedoch aktuell in 7 von 7 IDDM-Patienten beobachtet. Hierbei kam ein neues immunsuppressives Protokoll ohne Kortikosteroide zur Anwendung (Shapiro *et al.* 2000). Von 12 mit diesem Protokoll behandelten Patienten wurden 11 insulinunabhängig, und 9 dieser Patienten mussten auch nach einem Zeitraum von 20 Monaten kein exogenes Insulin zuführen (Ryan *et al.* 2001) Es bleibt abzuwarten, ob diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen reproduziert werden können.

## ***Mögliche Ursachen für eine beeinträchtigte Funktion von Inseltransplantaten***

Ob ein Inseltransplantat ausreichend funktioniert, hängt mit vielen Faktoren zusammen. Dazu gehören unter Anderem die Bedingungen bei der Inselgewinnung, das Ausmaß des

## Einleitung

---

Engraftments (das „Angehen“ des Transplantats am Transplantationsort), die zelluläre und humorale Entzündungsreaktion, die allo- und autoimmune Abwehrreaktion, die Toxizität der immunosuppressiven Medikation, oder auch der Bedarf des Organismus an Insulin.

In dieser Arbeit soll vor allem auf die immunologische Abwehrreaktion eingegangen werden. Diese ist eng vergesellschaftet mit der frühen Entzündungsreaktion, die ausführlich in einer gleichzeitig eingereichten anderen Promotionsschrift von T. Eckhard aus dem Gießener Inseltransplantationslabor behandelt wird. Vieles deutet darauf hin, dass sich Entzündung, Zellschäden und immunologische Abstoßung gegenseitig bedingen und verstärken.

## Grundlagen der Transplantationsimmunologie

Gewebe und Organe werden heute aus medizinischen Gründen transplantiert, um funktionelle Defizite zu beheben. Bei Übertragung von Gewebe eines Spenders auf einen genetisch differenten Empfänger kommt es zur Reaktion des Immunsystems des Empfängers, das fremde Gewebe wird zerstört, soweit dies nicht durch immunosuppressive Maßnahmen verhindert wird.

## Einteilung der Abstoßungsreaktionen

Abstoßungsreaktionen werden nach ihrem klinischen Auftreten in hyperakut, akut und chronisch unterteilt.

**Hyperakute Abstoßung** wird durch präformierte Antikörper bedingt (z.B. natürliche Antikörper gegen Oberflächenmerkmale diskordanter Spezies). Die Rejektion erfolgt innerhalb von Stunden nach erfolgter Gewebsübertragung und verläuft dramatisch: Antikörper richten sich gegen MHC des Donor-Endothels, das aktiviert und in seiner Funktion beeinträchtigt wird, Gerinnung und Komplementkaskade werden aktiviert, das Organ wird durch Ödem und Hämorrhagie im Gewebe und Thrombose der Gefäße zerstört (Kupiec-Weglinsky und Hancock, 1996). Eine vergleichbare antikörperbedingte Reaktion ist die Lyse der Erythrozyten, wie sie nach Transfusion von Blut inkompatibler Blutgruppen vorkommt. Bei der Allotransplantation kann die Gefahr der hyperakuten Rejektion im Vorfeld der Transplantation durch Cross-match (Reaktion von Empfänger-Serum und Spender-

## Einleitung

---

Lymphozyten in Anwesenheit von exogenem Komplement) erkannt und so vermieden werden.

Die **akute Abstoßung** tritt einige Tage bis Wochen nach Transplantation auf. Sie ist auf eine Aktivierung von T-Lymphozyten und darauffolgende effektorische Mechanismen zurückzuführen. Akute Abstoßung wird möglicherweise durch Zellschäden („early injury“) begünstigt, die über eine unspezifisch-inflammatorische Reaktion eine Immunantwort induzieren. Diese akute Immunantwort unterhält einen Kreislauf aus erneutem Zellschaden und erneuter Entzündung, der schließlich ein Transplantat zerstören kann. Es wurde beobachtet, dass Nierentransplantate um so wahrscheinlicher ihre Funktion einstellten, wenn eine Episode akuter Abstoßung im Verlauf aufgetreten war. Akute Abstoßung trat wiederum häufiger bei Organen auf, die Zellschäden (akute tubuläre Nekrose) aufwiesen. Hatte ein Organ zwar Zellschäden, erfuhr aber keine akute Rejektion, war langfristige Schädigung eher unwahrscheinlicher (Halloran *et al.* 1997). Als begünstigende Grundlage der Abstoßung wird z.B. die vermehrte Expression von MHC II und anderen zellulären Molekülen auf der Zelloberfläche angesehen. Nach Stress des Gewebes durch prolongierte kalte Ischämiezeit wurde eine vermehrte Infiltration und ein früherer Beginn der histologischen Zeichen der Abstoßung allogenen transplantierten Rattennieren nachgewiesen (Kouwenhoven *et al.* 2001). Auf die zellulären Mechanismen der akuten Abstoßung wird später detailliert eingegangen.

Die Abstoßung eines Transplantates kann sich auch „chronisch“ über Monate und Jahre erstrecken. Über die Mechanismen der **chronischen Abstoßung** sind wenig gesicherte Erkenntnisse vorhanden. Die Gefäße sklerosieren, und das Transplantat stellt letztlich seine Funktion ein.

## Wiederkehrende Autoimmunität bei transplantierten Typ I-Diabetikern

Pankreatektomierte Patienten ohne Typ I-Diabetes, die eine allogene Inseltransplantation erhielten, weisen eine gute Funktionsrate des Transplantats auf. Typ I-Diabetiker mit allogenen Inseltransplantat zeigen schlechtere Ergebnisse und häufigeres Transplantatversagen (Hering *et al.* ITR Newsletter 1996; Hering und Ricordi 1999).

Diese Ergebnisse sind auf die besondere Situation beim Typ I-Diabetiker zurückzuführen: Die ursprüngliche Inselmasse wird durch autoimmune Vorgänge zerstört. Nach der Vernichtung

## Einleitung

---

des Inselgewebes bildet sich die Insulitis zurück, initial als hohe Titer nachweisbare Antikörper sinken im Laufe des weiteren Lebens ab. Wird nun ein Typ I-Diabetiker mit Insel- oder Pankreasgewebe transplantiert, kehrt trotz Immunsuppression die Autoimmunität zurück und bedroht das neue Inselgewebe. In der Biopsie eines subkutanen Inseltransplantats bei einem Typ I-Diabetiker wurden 14 Tage nach Transplantation zelluläre Infiltration und ein Verlust an insulinproduzierenden Zellen gefunden (Stegall *et al.* 1995).

Die Antikörpertiter gegen Inselgewebe steigen nach Transplantation erneut an. Es wurden Zusammenhänge zwischen hohem Titer an GAD56 und Transplantatversagen beobachtet (Jäger *et al.* 1996), in einer prospektiven Studie zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Transplantatüberleben bei Patienten mit hohen/niedrigen Titern von ICA und GAD56-Antikörpern (Jäger *et al.* 1997). Bisher verwendete Immunsuppressiva können das Wiederaufflackern der Autoimmunität nicht verhindern.

## Heutige Therapie der immunologischen Abstoßung von Inseltransplantaten

Da es gegenwärtig noch kein klinisch akzeptiertes Verfahren zur Toleranzinduktion gibt, werden nach Organtransplantationen lebenslanglich Medikamente eingesetzt, welche die Abstoßung des Gewebes durch das Immunsystem des Empfängers verhindern sollen.

Es ist wegen der damit verbundenen Nebenwirkungen (Infektionen, kardiovaskuläre Krankheiten, Entstehung von Tumoren) wünschenswert, mit möglichst geringen Mengen an Immunsuppressiva auszukommen. Höchstes Ziel für die Organtransplantation wäre die Möglichkeit der Erzeugung von Toleranz. Ein Schritt in Richtung Abschwächung der Immunogenität stellen Immunomodulation (in-vitro-Vorbehandlung von Inseln) und Immunoisolation (Mikroverkapselung von Inseln) dar, diese konnten allerdings in der klinischen Anwendung die Abstoßung bisher nicht verhindern.

Zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen werden bisher Medikamente wie z.B. Azathioprin, Cyclosporin, Steroide, Mycophenolate Mofetil oder Tacrolimus verwendet.

Es werden auch monoklonale Antikörper eingesetzt (Moab), diese bewirken Depletion bestimmter Zelltypen. Moab zeigten z.B. bei humanen Nierentransplantaten (NIH Cooperative Clinic Trials, 1997) und Inselallotransplantaten an Primaten (AntiCD154; Kenjyon *et al.* 1999) gute Erfolge im Hinblick auf das Transplantatüberleben. Klinisch



## Einleitung

---

werden zur Induktions-Immunsuppression Anti-Lymphozyten- und Anti-Thymozytenserum erfolgreich verwendet.

Wegen der starken Nebenwirkungen der routinemäßig über lange Zeit anzuwendenden Immunsuppressiva wurden bisher im Regelfall nur Patienten mit Pankreas- oder Inselgewebe transplantiert, die wegen bestehender diabetischer Spätkomplikationen ein Nierentransplantat gleichzeitig bekamen oder bereits bekommen hatten. Diese Patienten benötigten ohnehin lebenslange Immunsuppression, um die Rejektion der Niere zu unterdrücken. Alleinige Pankreas- oder Inseltransplantation war unter diesen Voraussetzungen nur in seltenen, schwer einstellbaren Fällen von Diabetes mellitus, z.B. bei gestörter Hypoglykämiewahrnehmung, gerechtfertigt (Sutherland *et al.* 1988, Meyer *et al.* 1998, Shapiro *et al.* 2000).

## Die „Alarmtheorie“

Das Verständnis von der Natur der immunologischen Reaktion hat sich gewandelt; nicht der Unterschied zwischen „Selbst“ und „Fremd“ könnte die treibende Kraft für eine Immunantwort sein, die Abwehr „gefährlicher“ und Toleranz „ungefährlicher“ Substanzen scheint evolutionär gesehen sinnvoller.

Die dendritische Zelle, die „professionelle“ antigenpräsentierende Zelle (APC), ist eine wichtige Schaltstelle der Immunantwort. APC nehmen wahllos Peptide aus der Umgebung auf, prozessieren und präsentieren diese. An Zellkulturen konnte beobachtet werden, dass dendritische Zellen nur dann aktiviert wurden, wenn gestresste, beschädigte, nekrotische oder viral infizierte Zellen anwesend waren. Zellen, die dem „vorgesehenen“ programmierten Zelltod erlagen, lösten keine Aktivierung aus (Gallucci *et al.* 1999). Eine Immunantwort wird initiiert, wenn Gefahr droht, d.h. Körperzellen geschädigt werden und Gewebe untergeht. Nur dann werden APC befähigt, kostimulatorisch wirksam zu werden und den anderen Immunzellen „Signal 2“, das Zeichen zur Aktivierung, zu übermitteln. Zellschädigung wird durch sogenannte „Alarmsignale“, entweder über Stresssignale (z.B. Expression von Heat shock proteines auf der Zellmembran) oder über passives Freiwerden intrazellulärer Bestandteile des betroffenen Gewebes vermittelt („danger model“, Matzinger, 1994). Dieser theoretische Ansatz wird hier als „Alarmtheorie“ bezeichnet.

## Einleitung

---

Eine Übertragung dieses Konzepts auf die Transplantationsimmunologie bedeutet, dass Transplantate eher eine Immunantwort erfahren, wenn gestresste, beschädigte Zellen vorhanden sind. Dies konnte unter anderem bei der Nierentransplantation beobachtet und nachgewiesen werden (Halloran *et al.* 1997).

### Schädigung von Inseln durch inflammatorische Prozesse

Inselgewebe wird sehr leicht durch inflammatorische Prozesse zerstört. Bereits während der initialen Entwicklung des Diabetes mellitus sind neben den direkt durch T-Zellen verursachten autoimmunen Vorgängen (Schädigung durch MHC-I restringierte zytotoxische T-Zellen, Verlust der Toleranz gegen  $\beta$ -Zell-Antigene) vor allem Entzündungsmediatoren aus aktivierten Makrophagen (Zytokine, NO, Sauerstoffradikale) beteiligt. Dabei ist die selektive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch unspezifisch-inflammatorische Prozesse so zu erklären, dass diese von allen Inselzelltypen am empfindlichsten auf die Mediatoren reagieren (Kolb *et al.* 1995).

Es ist wahrscheinlich, dass auch transplantierte Inseln durch Entzündungsmediatoren geschädigt werden, die sich in der unmittelbaren Umgebung des Transplantationsortes befinden (Nagata *et al.* 1990, Rabinovitch *et al.* 1996), beziehungsweise in der Insel selbst wirksam werden.

### Schädigung von Inseln durch LPS

Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine bilden zusammen mit Proteinen und Phospholipiden die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien. Sie sind an Vorgängen des Bakterienwachstums und Stoffwechsels beteiligt. Sie spielen als Oberflächenmoleküle eine wichtige Rolle bei der Auseinandersetzung höherer Organismen mit gramnegativen Bakterien. Deren Abwehrsystem erkennt die Bakterien an ihren Oberflächenstrukturen und reagiert mit der Bildung von Antikörpern. Freigesetztes LPS wirkt als „Endotoxin“ und ist entscheidend an der Pathogenese von lokalen und systemischen Krankheitsbildern beteiligt. Vom chemischen Aufbau her bestehen Endotoxine aus Polysaccharid-Ketten, an die kovalent ein Lipid-Anteil, das sogenannte Lipoid A, gebunden ist (Rietschel *et al.* 1991).

## Einleitung

---

Für die Inseltransplantation ist das LPS insofern von Bedeutung, als dass Isolations- und Reinigungs- und Kulturmedien teilweise große Mengen LPS enthalten. Dieses setzt sich beim Isolationsvorgang am Inselgewebe fest und kann so Entzündungs- und immunologische Abstoßungsvorgänge triggern. Es wurde nachgewiesen, dass in den Inseln residente Makrophagen bereits während des Isolationsvorganges proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) freisetzen (Vargas *et al.* 1998, Jahr *et al.* 1999), die ihrerseits die Inseln schädigen (Corbett *et al.* 1993, Rabinovitch *et al.* 1996).

## Transplantaterkennung durch das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus sehr unterschiedlich funktionierenden Zellen zusammen. Die verschiedenen Zelltypen arbeiten gemeinsam, sie kommunizieren mittels Rezeptoren und Zytokinen, den zellulären Botenstoffen. Zentren der Kommunikation des lymphatischen Systems stellen spezialisierte Gewebe dar, wie z.B. Lymphknoten, Milz und Tonsillen. Diese Gewebe bilden die Umgebung, in der Lymphozyten miteinander und mit Antigenen reagieren und eine angelaufene Immunantwort in Gang halten. Das Immunsystem verteidigt den Körper gegen eindringende, schädliche Substanzen. Hierunter fallen z.B. Bakterien, Viren und Parasiten. Diese können Organe bzw. Zellen harmlos kolonialisieren (z.B. residente Flora der Haut, Darmflora), aber auch empfindlich schädigen, wie dies bei Infektionskrankheiten der Fall ist. Um zu erkennen, welche Substanz „harmlos“ und welche „gefährlich“ ist, muss es eine Kommunikation zwischen den Körperzellen und den Zellen des Immunsystems geben (Matzinger, 1994; Gallucci *et al.* 1999). Diese Kommunikation ist möglicherweise ursächlich an der Abstoßung transplanterter Gewebe beteiligt.

Man unterscheidet die phylogenetisch ältere, „angeborene“ von der „erworbenen“ Immunität. Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch, erkennt gefährliche Bakterien an den Kohlenhydratmustern auf der Zelloberfläche und reagiert sehr schnell.

Das erworbene Immunsystem ist spezifisch, d.h. jede Zelle bekämpft genau das eine Antigen, gegen das der Rezeptor gerichtet ist. Dabei entsteht unendliche Vielfalt der Spezifität durch Rekombination der genetischen Eigenschaften bei der Herstellung von Antikörpern. Das erworbene Immunsystem vermag von sich aus nicht, gefährliche und ungefährliche Substanzen zu unterscheiden (Fearon und Locksley, 1996). Deshalb ist die gegebene Zusammenarbeit beider Systeme sinnvoll.

## Einleitung

---

Jede Immunantwort setzt voraus, dass ein Pathogen oder anderes Fremdmaterial erkannt wird, um es bekämpfen zu können. Zellen erkennen andere Zellen, z.B. Mikroorganismen oder auch Transplantate, an ihren Oberflächenstrukturen, an Antigenen und Epitopen.

Alle Körperzellen haben auf ihrer Oberfläche organspezifische Antigenmuster. Zu den Antigenen gehört auch der Major Histocompatibility Complex, MHC. Die Moleküle des MHC bestehen aus Polypeptidketten. Sie sind dreidimensional strukturiert, und zwar so, dass in einer Vertiefung des Moleküls Peptide gebunden werden können, die im Zellinneren aufbereitet wurden. Die Moleküle des MHC sind entscheidend an der Abstoßung histoinkompatibler Transplantate beteiligt. Man unterscheidet MHC-Moleküle der Klasse I und II.

Klasse I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor. Auf diesen werden endogene Peptide aus zellulären Abbauvorgängen präsentiert, wobei jedes Organ sein eigenes, spezifisches Muster darbietet. Klasse II-Antigene finden sich auf antigenpräsentierenden Zellen, die zusätzlich zum zelleigenen Muster auch Peptide von phagozytierten Materialien (Zelltrümmer, Mikroorganismen) präsentieren. MHC-Moleküle spielen für die Immunantwort eine wichtige Rolle, weil die Spezifität der T-Zell-Interaktion durch Kontakt mit peptidbeladenen Klasse I- und II-Molekülen vermittelt wird. Dabei sind  $T_H$ -Zellen auf MHC II restringiert, d.h. der T-Zell-Rezeptor erkennt Peptide nur im Zusammenhang mit MHC II. Auf MHC I restringierte Zellen sind die zytotoxischen T-Lymphozyten und die T-Zellen mit Suppressorfunktion.

Die Aktivierung von Immunzellen erfolgt unter zwei Voraussetzungen: Immunzellen müssen Epitope spezifisch erkennen, z.B. der Rezeptor einer T-Zelle bindet mit dem MHC II einer antigenpräsentierenden Zelle und dem darauf präsentierten Antigen. Man bezeichnet diesen Kontakt auch als Signal 1. Weiterhin benötigen Zellen zu ihrer Aktivierung ein weiteres Signal, Signal 2, das auch „Kostimulation“ oder „Hilfe“ genannt wird. Diese Aufgabe wird von akzessorischen Molekülen übernommen, die auch auf den Zellmembranen zu finden sind.

Signal 1 alleine ohne 2 vermag nicht, die Zelle zu aktivieren, vielmehr wird Toleranz bzw. klonale Anergie bewirkt. Signal 1 und 2 im Zusammenhang bewirken eine Aktivierung. Fehlt das zweite Signal, können T-Zellen nicht aktiviert werden, es kommt zu „Toleranz“ oder „klonaler Anergie“ der entsprechenden T-Zellen.

## Einleitung

---

### Zellulärer Ablauf der Immunaktivierung

Grundlegende Bedeutung für das Zustandekommen einer Immunantwort hat die Interaktion zwischen **antigenpräsentierenden Zellen** (APC) und  $CD4^+$  T-Helfer-Lymphozyten ( $T_H$ -Zellen).

Mehrere Zellarten können Antigen präsentieren (Makrophagen, aktivierte B- und T-Zellen, Gewebsmakrophagen und Blutmonozyten). Für das Auslösen der primären Immunantwort sind jedoch wahrscheinlich allein die gewebsständigen **dendritischen Zellen** (DC) maßgeblich, weil sie MHC und kostimulatorische Moleküle an ihrer Zelloberfläche in besonders hoher Dichte exprimieren können. DC nehmen Antigenfragmente wie z.B. phagozytierbares Material aus der Umgebung auf. Im endoplasmatischen Retikulum werden die Antigene zerstückelt (prozessiert) und mit MHC II gekoppelt an der Zelloberfläche präsentiert. DC wandern dann in die lokalen Lymphknoten, wo sie auf  **$T_H$ -Zellen** treffen.  $T_H$ -Zellen erkennen mit dem T-Zell-Rezeptor präsentierte Peptide, wenn diese mit MHC II-Molekülen im Zusammenhang stehen. Durch ein **zweites Signal** der DC, das kostimulatorisch wirkt, und das vermutlich nur bei Vorliegen von „Alarmsignalen“ eine wirksame Stärke erreicht, werden  $T_H$ -Zellen aktiviert. Als wichtiges zweites Signal wurde die Interaktion des  $T_H$ -Zell-Rezeptors CD28 mit den CD28-Liganden der APC (CD80, CD86) identifiziert, es gibt jedoch eine Reihe weiterer APC-T-Zell-Interaktionen, welche als Zweitsignal wirken oder dieses verstärken können.

DC und andere APC kommen auch in transplantierten Geweben vor und werden vom Spender auf den Empfänger übertragen. Deshalb können  $T_H$ -Zellen bei transplantierten Individuen auf zwei unterschiedliche Arten aktiviert werden; durch APC des Spenders, die an ihrer Oberfläche Peptide aus zellulären Abbauvorgängen des Spendergewebes präsentieren (**„direkte Aktivierung“**) oder durch dendritische Zellen des Empfängers, die Material aus geschädigten Zellen des Transplantats auffangen und präsentieren (**„indirekte Aktivierung“**). Aktivierte  $T_H$ -Zellen können dann andere Immunzellen aktivieren, z.B. über sezernierte Zytokine.

Für die Vernichtung gefährlichen Materials sind spezialisierte **Effektorzellen** zuständig, die in Vorstufen vorliegen und durch Aktivierung in die effektive Form gebracht werden. Effektorzellen (Zytotoxische T-Zellen, Plasmazellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten) sind wie gefährliche, geladene Waffen, es ist für den Körper sicherer, die Effektorzellen in Vorstufen parat zu halten und bei Bedarf zu aktivieren.  $T_H$ -Zellen sind

## Einleitung

---

offenbar in der Lage, den für das Pathogen passenden, wirksamsten Effektormechanismus gezielt auszuwählen. T-Lymphozyten als Effektorzellen erkennen mit MHC I-Molekülen spezifisch die Zielstrukturen für die Effektorfunktion.

Wenn eine Immunantwort gegen Transplantatgewebe einmal initiiert ist, werden Transplantate von Effektorzellen angegriffen und geschädigt oder zerstört,

Die zelluläre Immunantwort interagiert vielfältig mit der unspezifischen, angeborenen Immunantwort. Das unspezifische Immunsystem kann Moleküle wahrnehmen, die auf infektiösen Mikroorganismen vorkommen, z.B. LPS. Es schlägt die Auswahl der Antigene vor, gegen die B- und T-Zellantwort gerichtet sein sollen, und welche Zytokine von T-Lymphozyten sezerniert werden sollen, damit die wirksamste Art der Immunantwort erfolgen kann (Fearon und Locksley, 1996). An der Entscheidung für die Art der Immunantwort sind Makrophagen beteiligt, die entsprechende Zytokine produzieren und damit die Differenzierung von T<sub>H</sub>-Zellen in Th1- und Th2-Zellen vorbestimmen. So kann Typ I-Antwort (T<sub>H1</sub>-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , Makrophagen schütten mehr NO aus) von Typ II-Antwort unterschieden werden (T<sub>H2</sub>-Zellen sezernieren IL4,5,6,10,13, Mastzellen und eosinophile Granulozyten proliferieren, die Makrophagenaktivität wird gehemmt). Makrophagen wirken außerdem als APC für „erfahrene“ T<sub>H</sub>-Zellen, die vorher schon mit Antigen in Kontakt gekommen waren.

Auch das Komplementsystem interagiert mit der zellulären Immunantwort. So haben z.B. B-Zellen einen Rezeptor (CD21) für Komplement, der die Fähigkeit der Anbindung an mikrobiellen Strukturen erhöht.

## Vermutete Wirkung von Alarmsignalen bei der Abstoßung von Transplantaten

Eine essentielle Funktion des Immunsystems ist es, zwischen „gefährlichen“ und „ungefährlichen“ Substanzen unterscheiden zu können. APC nehmen Antigenfragmente aus Umgebung wahllos auf und präsentieren sie. Der Körper schützt sich vor einer groß angelegten Zerstörung des eigenen Gewebes dadurch, dass die meisten autoreaktiven Lymphozyten entweder bereits im Laufe ihrer Entwicklung im Thymus eliminiert wurden (zentrale Toleranz) oder durch periphere Mechanismen tolerant gehalten werden. Die periphere Toleranz kann jedoch durchbrochen werden, wenn es z.B. durch die von

## Einleitung

---

Virusinfektionen ausgehenden Signale zu einer erhöhten Expression von Signal 1- und 2-Molekülen und Rezeptoren auf den Gewebezellen und/oder T-Lymphozyten kommt. Auf diese Weise lässt sich das Entstehen von Autoimmunerkrankungen, auch des Typ I-Diabetes, zumindest teilweise erklären.

Da Toleranz ein aktiver Prozess ist, der einen vorherigen Kontakt der T-Zellen mit dem entsprechenden Antigen unter tolerogenen Bedingungen voraussetzt, besteht gegenüber körperfremden Antigenen primär keine Toleranz. Das gilt auch für Moleküle, die zwar körpereigen, jedoch bisher nicht in Kontakt mit dem Immunsystem getreten sind (z.B. Proteine ausschließlich intrazellulärer Lokalisation). Damit das Auslösen einer aggressiven Immunantwort gegenüber harmlosen Substanzen vermieden wird, und das Immunsystem sich auf gefährliche Eindringlinge konzentrieren kann, muss es zwischen ungefährlich und gefährlich unterscheiden können. Es ist notwendig, dass bei für den Organismus gefährlichen Situationen „Alarmsignale“ an das spezifische Immunsystem übermittelt werden.

Eine Gefährdung für jeden Organismus sind pathogene Infektionen. Eine durch Mikroben erfolgende Auslösung von inflammatorischen Vorgängen des unspezifischen Immunsystems stellt einen relativ eindeutigen und generell akzeptierten Mechanismus der Aktivierung der spezifischen, T-Zell-abhängigen Immunantwort dar.

Schwieriger ist das Verständnis der Faktoren, die zur Auslösung spezifischer Immunantworten gegen nichtmikrobielle Antigene führen, und die nicht auf einer Bystander-Reaktion gegen Mikroorganismen beruhen. Eine solche Situation ist die Abstoßung infektfreier allogener und xenogener Organtransplantate.

Entsprechend der „Alarmtheorie“ wäre die bloße Existenz fremder Antigene (in diesem Fall der MHC- und nicht-MHC-Alloantigene) und darauf potentiell reaktionsfähiger T-Lymphozyten beim Organempfänger noch kein ausreichender Grund dafür, dass es auch tatsächlich zu einer aktiv gegen das Transplantat gerichteten Immunantwort kommt. Es muss also angenommen werden, dass bei der Organ- und Gewebstransplantation neben der Antigendisparität weitere Faktoren wirksam sind, die eine Abstoßung bewirken. Bei der Inseltransplantation kommen dafür z.B. Zelltrümmer und LPS in Frage.

### **Vermutete Rolle von LPS als Alarmsignal bei der Abstoßung von Inseltransplantaten**

LPS ist ein Molekül, das auf vielfältige Weise inflammatorisch wirkt. Es ist Bestandteil der Oberflächenmembran vieler gramnegativer Bakterien. Die Anwesenheit von LPS signalisiert dem angeborenen Immunsystem das Vorliegen einer Infektion, denn die Molekülsequenzen können vom unspezifischen Immunsystem direkt erkannt werden.

So haben z.B. Makrophagen Rezeptoren für LPS. Wird LPS erkannt, werden sofort Zytokine ausgeschüttet, die andere Immunzellen (z.B. T<sub>H</sub>-Zellen) über das Vorliegen der angenommenen „Infektion mit LPS-haltigen Mikroben“ informieren und aktivieren (Fearon und Locksley, 1996). Ausgeschüttete Zytokine sind z.B. IFN- $\gamma$  (Le *et al.* 1986) und TNF- $\alpha$ , außerdem werden proinflammatorische Substanzen wie NO (Zhang und Morrison 1993) oder auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pabst and Johnston 1980) von den Makrophagen sezerniert.

Auch natürliche Killerzellen (NK), die zytolytisch wirken, besitzen Rezeptoren für LPS.

LPS aktiviert zudem über den alternativen Weg die Komplementkaskade. Produkte der Komplementkaskade wirken opsonierend und aktivierend auf Immunzellen.

Auch die Antigenpräsentation wird durch LPS beeinflusst, z.B. werden MHC II bei gleichzeitiger Anwesenheit von IFN- $\gamma$  auf Makrophagen vermehrt exprimiert (Sicher *et al.* 1995). DC werden zur Differenzierung angeregt und wandern vermehrt in spezialisierte, T-Zell-reiche Gebiete des Lymphgewebes, wo eine spezifische Immunantwort angeregt wird.

Zudem können B-Zellen von LPS T-Zell-unabhängig aktiviert werden.

Da LPS aus den zur Inselisolation verwendeten Chemikalien an Zellen von Inseln bindet und sich nicht entfernen lässt (Jahr *et al.* 1999b), kann angenommen werden, dass besonders die unspezifische Inflammation, die durch LPS ausgelöst wird, die empfindlichen Inselzellen des Transplantats schädigen kann. LPS kommt bei der Inseltransplantation als wichtiger Induktor von „Alarmsignalen“ in Frage.



# Fragestellungen

Wenn man klinische Insel- und Pankreastransplantation vergleicht, ergibt sich ein kürzeres Transplantatüberleben für die Inseln. Was ist der Grund für die schlechtere Funktion der Inseln im Vergleich zu Pankreastransplantaten?

1. Langerhans-Inseln werden durch enzymatische Digestion aus dem Gewebeverband herausgelöst. Dabei werden Zellen lysiert und somit abgetötet. Bei humanen Inselpräparationen sind stets abgetötete Zellen sowohl in den Inseln als auch in nichtendokrinen Gewebebeimengungen enthalten. Sind diese lytisch geschädigten Zellen verantwortlich für die starke Immunantwort auf allogene humane Inseln? Inseln von Nagetieren lassen sich im Unterschied zu humanen Inseln mit nahezu 100%iger Vitalität und praktisch frei von nichtendokrinen Verunreinigungen präparieren. Solche Inseln werden bei der Allotransplantation Ratte-in-Ratte unter verschiedenen immunsuppressiven oder tolerogenen Protokollen relativ gut akzeptiert. Bei der Insel-Xenotransplantation Ratte-in-Maus beträgt die Zeit bis zur Rejektion ausnahmslos über eine Woche, zum Teil wird sogar spontane Langzeitakzeptanz ohne jede Immunsuppression der Empfänger beobachtet (Gotoh *et al.* 1987, Jahr *et al.* 1999a). Wenn die im Vergleich zu Ratteninselpräparationen höhere Immunogenität der humanen Inselpräparationen auf von toten Zellen ausgehenden „Alarmsignalen“ beruht, sollte sich auch die Immunogenität von Ratteninseln, denen absichtlich tote Inselzellen beigemischt wurden, deutlich erhöhen. Da aus der Literatur entsprechende Untersuchungen nicht bekannt sind, soll diese Fragestellung in der vorliegenden Arbeit geprüft werden.
2. Kollagenase und auch Dichtegradienten, die zur Isolation verwendet werden, enthalten häufig große Mengen LPS (Linetsky *et al.* 1998, Jahr *et al.* 1999b). Während der Isolation werden Inseln mit Endotoxin kontaminiert. LPS haftet und wird auch durch exzessive Waschvorgänge nicht entfernt. LPS ist ein Bestandteil der Oberfläche gramnegativer Bakterien und stellt einen potenten inflammatorischen Faktor dar. Trägt dieser auch zur Inflammation und Abstoßung der Inseltransplantate bei? In wie fern ist von der Verwendung endotoxinarmer Kollagenase (Liberase®) und geprüft endotoxinfreier Reinigungsmedien nicht nur eine Verminderung der zur

## Einleitung

---

Transplantation benötigten Inselmasse (Eckhard *et al.* 1999), sondern auch eine Verzögerung der immunologischen Abstoßung zu erwarten?

Könnte sich eine Hochreinigung der Inseln im Sinne einer verbesserten Langzeit-Transplantatfunktion infolge geringerer immunologischer Abstoßung auszahlen, wenn dafür zusätzliche Verluste endokriner Gewebsmasse hingenommen werden müssen? Könnte eine absolut endotoxinfreie Präparation der Inseln die immunologische Rejektion vermindern?

## *Versuche zur Beantwortung der Fragestellungen*

Mit den vorliegenden Experimenten sollte untersucht werden, ob Verunreinigungen transplanterter Langerhans-Inseln mit Zelldetritus und LPS höhere Immunogenität bedingen, damit eine heftigere, schnellere Abstoßungsreaktion im Sinne der „Alarmtheorie“ erfolgt, und somit das Überleben des Transplantates verkürzt wird.

Durch Kollagenasedigestion, Dichtegradientenzentrifugation, Handverlesen und 24 h-Kultur gewonnene Inseln aus Lewis-Ratten wurden transrenal unter die Nierenkapsel von diabetischen C57Bl/6J-Mäusen transplantiert. Dabei wurde mit einem Überschuss an Inseln (im Vergleich zu für die initiale Blutglucosenormalisierung notwendigen Inselmasse) gearbeitet, um auch bei erhöhter früher, unspezifischer inflammatorischer Zerstörung eines Teils der Inseln (Eckhard *et al.* 1999) die immunvermittelte Abstoßung der verbleibenden Zellen eindeutig beobachten zu können.

Für den Versuch wurden folgende Gruppen gebildet, deren Transplantat jeweils das aufgeführte Material enthielt:

- |                               |                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1. „Kontrollgruppe“           | 200 vitale Inseln                             |
| 2. „LPS-Gruppe“               | 200 vitale Inseln, Zusatz von LPS zum Medium  |
| 3. „Zelltrümmer-Gruppe“       | 200 vitale Inseln + 200 abgetötete Inseln     |
| 4. „Zelltrümmer + LPS-Gruppe“ | 200 vitale LPS-Inseln + 200 abgetötete Inseln |

Im Sinne der Alarmtheorie wurde erwartet, dass die Gruppen 2, 3 und 4 schneller abstoßen als die Kontrollgruppe. Abstoßung wurde am Wiederanstieg der Blutglucose erkannt.

# Material und Methoden

## Kulturmedium

Als Kulturmedium wurde eine Medium199-Zubereitung mit Zusatz von 5% komplementinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS) mit niedrigem Endotoxingehalt verwendet (TCM-199/5% FCS). Das Medium ist carbonatfrei, so dass an Luft ohne Veränderung des pH-Wertes gearbeitet werden kann. Die Eignung dieses Mediums für die Inselkultur vor Transplantation wurde unter anderem durch erfolgreiche ein-Spender /ein-Empfänger-Inseltransplantation mit in TCM-199 / 5% FCS vorkultivierten Inseln im allogenen Rattenmodell nachgewiesen (Jahr *et al.* im Druck). Das komplette Kulturmedium war im Test mit dem entsprechenden Immunoassay Kit (Roche, Mannheim) frei von Mycoplasmen.

Das Medium enthielt folgende Endkonzentrationen: TCM-199, 5% FCS, 2 mmol/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 20 mmol/l Hepes (pH=7,4), 100 IU/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin. Es wurde aus folgenden Chemikalien angesetzt:

TCM-199, w/o Carbonate, w/o Hepes, with L-Glutamine, 10fach	Gibco, Paisley, Scotland
Aqua dest, pyrogenfrei	Pharmacia Upjohn
Hepes-Buffer, 1M,	Biochrom, Berlin
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine, 200 mM,	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Bio Whittaker, Verviers
NaOH, 10 M	Serva, Heidelberg
FCS, Charge 30 L, endotoxinarm	Biochrom, Berlin

## Endotoxin (Lipopolysaccarid, LPS)

### Endotoxinbestimmung

Der "Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate"-Test-Kit (BioWhittaker, Walkersville, USA) weist Endotoxin in Lösungen nach. Wenn LPS vorhanden ist, wird ein Proenzym aus Amöbocyten aus dem Blut einer Krebsart (*Limulus polyphemus*) zu einem Enzym umgewandelt. Dieses katalysiert die Freisetzung eines gelben Farbstoffes aus einem Substrat. Im Spektrophotometer kann anhand einer Eichkurve der LPS-Gehalt einer Lösung quantitativ bestimmt werden.

## **Material und Methoden**

---

Die Endotoxinbestimmung wurde an Isolations- und Kulturmedien sowie isolierten Inseln nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **Endotoxinbestimmung an isolierten Langerhans-Inseln**

Isolierte Langerhans-Inseln aus Lewis-Ratten, präpariert nach Standardverfahren, wurden auf ihren Gehalt an Endotoxin untersucht. Es wurden 1.) frisch isolierte Inseln, 2.) Inseln die 24 h in TCM 199/ FCS inkubiert worden waren, und 3.) Inseln, die in TCM 199/ FCS mit 10 µl LPS / ml Medium inkubiert worden waren, untersucht.

Es wurden Aliquots zu jeweils 200 Inseln gebildet, dies entsprach der Menge Inseln, die auch in den Transplantationsversuchen verwendet wurden.

Die frisch isolierten Inseln wurden sofort mit NaCl gewaschen. Die mit und ohne Zusatz von LPS 24 h inkubierten Inseln wurden ebenfalls mit NaCl gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Sediment mit 200 µl NaCl aufgeschwemmt. Mit dem Ultraschallhomogenisator wurden die Inseln zertrümmert. Die entstandene Lösung wurde zur LPS-Bestimmung verwendet.

### **Nachweis der Aktivität der verwendeten Endotoxin-Charge**

Um die biologische Wirksamkeit der verwendeten LPS-Präparation nachzuweisen, wurden Makrophagen aus der Milz von vier zur in-vivo-Voraktivierung (Braun *et al.* 1996) inseltransplantierten C57Bl/6J-Mäusen gewonnen und mit Zusatz von LPS kultiviert. Aus dem Kulturmedium wurde mit Griess-Reagenz der Gehalt an NO bestimmt.

### **Gewinnung der Milzzellen**

Aus vier C57Bl/6J-Mäusen, wurde die Milz entnommen. Die Milzen wurden durch ein feinmaschiges Netz in eine sterile Petrischale passiert. Der Zellbrei wurde mit TCM-199/5% FCS aufgeschwemmt. Die Suspension wurde im 10 ml Gewebekulturröhrchen auf einen Histopaque-Gradienten (Dichte 1,077) geschichtet und bei 4° C zentrifugiert.

## Material und Methoden

---

Nach der Zentrifugation zeigte sich auf dem Interface ein weißer Ring aus ca. 15% Makrophagen und 85% Lymphozyten (Differenzierung mit Türck'scher Lösung). Der Ring wurde mit einer sterilen Spritze aufgezogen. Die Zellen wurden mit TCM-199/5% FCS gewaschen, in der Neubauer-Zählkammer gezählt, die Endkonzentration eingestellt und die Suspension in eine sterile 96-Lochplatte verteilt.

### Ansatz der Kulturen

Je vier Ansätze (Endkonzentrationen: 0;  $1 \times 10^6$  ;  $2 \times 10^6$  ;  $3 \times 10^6$  und  $4 \times 10^6$  Milzleukozyten in 150  $\mu$ l TCM-199/5% FCS), entweder mit LPS (1  $\mu$ g/ml), oder ohne LPS (Kontrolle), inkubierten 24 h bei 37°C. Vom Überstand wurden jeweils 75  $\mu$ l zur NO-Bestimmung abgenommen und mit Griess-Reagenz versetzt (Griess, 1879). Die Rotfärbung wurde mit dem Plattenphotometer bei 540 nm gemessen und der NO-Gehalt der Ansätze anhand einer Eichkurve bestimmt (Green *et al.* 1982).

96-well tissue culture plate  
Gewebekulturröhrchen, 10 ml TC, steril  
Spritze, 5 ml  
Kanüle, 1,2 x 40  
Nylonnetz, steril, Maschenweite 100  $\mu$ m  
Histopaque 1077  
LPS-Lösung (1mg/ml; Serotyp 055:B5)

Falcon, Le Pont de Claix  
Greiner, Frickhausen  
Braun, Melsungen  
Braun, Melsungen  
  
Sigma, St. Louis  
Sigma, St. Louis

### Tiere (Inselspender und Empfänger)

Die Tiere wurden bis zur Versuchsdurchführung im Tierstall der Medizinischen Poliklinik bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser und Altromin-Pellets (Altromin GmbH, Lage) war stets gewährleistet. Die Versuche entsprachen den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes. Die Nummer der Tierschutzgenehmigung lautet Gi 20/11-1/99 (Regierungspräsidium Gießen).

Zur Inselgewinnung wurden männliche Ratten vom Inzuchtstamm Lewis verwendet. Die Ratten wurden bei der Firma Harlan-Winkelmann aus Borcheln mit einem Körpergewicht von 220-250 g im Alter von 12-15 Wochen bezogen. Die Isolation erfolgte, nachdem die Ratten ein durchschnittliches Körpergewicht von 300-320 g erreicht hatten. Als Transplantatempfänger wurden männliche Mäuse vom Inzuchtstamm C57Bl/6J verwendet. Die Mäuse wurden bei der Firma Harlan-Winkelmann aus Borcheln mit einem Körpergewicht

## Material und Methoden

---

von 20-25 g im Alter von 5-6 Wochen bezogen. Nach abgeschlossenem Versuch oder misslungenem Versuch wurden die verwendeten Mäuse sofort mit Metofane® narkotisiert und getötet.

## *In-vitro-Untersuchungen mit Ratteninseln*

### Isolation

#### Distension und Entnahme des Pankreas

Auf der Feinwaage wurden 25 mg Kollagenase abgewogen und in 15 ml Hanks-Lösung aufgelöst. Die Kollagenasecharge Lot 09264 wies ausgesucht geringen LPS-Gehalt (0,2 ng/mg) auf. Nach steriler Filtration wurden 12 ml der Lösung in eine Spritze aufgezogen. Der angeschrägte Venenkatheder wurde aufgesteckt und die Spritze auf Eis gelagert. Die männliche Lewis-Ratte wurde durch i.p.-Injektion von 0,2 ml Narcoren® (Pentobarbital), verdünnt auf 1 ml mit physiologischer Kochsalzlösung, betäubt. Nach Eintreten der Bewusstlosigkeit wurde das Abdomen der Ratte mit einem elektrischen Rasierapparat rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Die Ratte wurde auf dem Rücken liegend in Eis gelagert. Die Bauchhaut wurde mit einer chirurgischen Pinzette in Höhe des Nabels gefasst und das Abdomen mit einer kleinen Schere V-förmig bis zum Rippenbogen eröffnet. Das Xiphoid wurde mit einer großen Schere abgeknipst. Zwischen Diaphragma und Leber wurde ein Ende einer Mullkompressen geschoben, die Leber durch leichten Druck luxiert, nach cranial umgeschlagen und mit dem anderen Ende der Kompressen fixiert. Der Leberhilus kam zur Darstellung. Mit der Klemme wurde der Ductus Choledochus distal des Abgangs des letzten Leberlappens unterfahren und ein Seidenfaden durchgezogen. Dieser wurde locker zum Knoten geschlungen, nicht festgezogen. Die Einmündung des Ductus Choledochus in das Duodenum wurde aufgesucht und distal mit der Klemme verschlossen. In den Ductus wurde proximal des Seidenfadens mit einer kleinen Schere ein Loch geschnitten, durch das der angeschrägte Polyethylenkatheder eingeführt wurde. Dieser wurde durch Zuziehen des Knotens fixiert. Ein leichtes Anspritzen mit Kollagenaselösung zeigte die korrekte Lage des Katheders. Daraufhin wurde die Ratte durch einen Schnitt in die großen Bauchgefäße ausgeblutet und so getötet. Das Pankreas wurde vollständig mit der Kollagenaselösung distendiert. Dann wurden Katheder, Seidenfaden und Klemme entfernt und das Pankreas

## Material und Methoden

---

durch stumpfe und scharfe Präparation aus der Ratte gelöst und in ein 10 ml Gewebekulturröhrchen verbracht.

### Digestion, Separation und Aufbereitung der Inseln

Die Dichtegradienten wurden wie folgt gemischt und auf Eis gelagert.

Bodenlayer (Dichte 1,090)	16,6 ml Ficoll solution (Dichte 1,100) + 2 ml Hanks-Lösung
Mittellayer (Dichte 1,077)	10 ml Histopaque
Toplayer (Dichte 1,040)	2 ml Histopaque (Dichte 1,077) + 10 ml Hanks-Lösung

Das Pankreas im fest verschraubten Gewebekulturröhrchen wurde zur Digestion in ein 37°C warmes Wasserbad gelegt. Nach zehnminütiger Inkubation wurde mit dem Reagenzglasschüttler maschinell auf höchster Stufe geschüttelt; dieser Vorgang wurde nach 13, 16, 18 und 21 Minuten wiederholt. Zum Abstoppen der Kollagenasewirkung wurde das Digest in ein 50 ml-Röhrchen verbracht und bis zur 45 ml Marke mit Hanks aufgefüllt. Das Röhrchen wurde dicht verschlossen und manuell kräftig geschüttelt. Dann wurde bei 700 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet noch einmal mit 45 ml Hanks aufgespült und abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet im eiskalten Bodenlayer aufgelöst. Größere Zellverbände und Lymphgewebe konnten mit einer 5 ml-Spritze und steriler Kanüle herausgenommen werden. Auf den mit Gewebe versetzten Bodenlayer wurden Mittel- und Toplayer geschichtet. Die Gradientenpräparation wurde bei 4°C mit 2000 U/min (840 g) zentrifugiert, es wurde auf erschütterungsfreies An- und Auslaufen geachtet. Die Inseln befanden sich nach der Zentrifugation auf dem Interface zwischen den Schichten der Dichte 1,040 und 1,077. Mit einer 10 ml-Spritze mit steriler Kanüle wurden die Inseln vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen verbracht. Mit eiskalter Hanks-Lösung wurden Rückstände der Dichtegradienten abgewaschen, der Überstand wurde verworfen. Die Inseln wurden mit 10 ml TCM-199/5% FCS aufgespült und in eine sterile Petrischale überführt.

Die hier beschriebene Isolationsmethode für Ratteninseln wurde 1996 auf der Grundlage vorangegangener Erfahrungen von T.Eckhardt im Gießener Insellabor entwickelt. Sie wird seitdem routinemäßig angewendet.

## Material und Methoden

---

### Kultur der Inseln

Mit einer 100 µl Eppendorf-Pipette mit steriler Spitze wurden die Inseln unter dem Stereomikroskop handverlesen und in eine Petrischale mit frischem TCM-199/5% FCS gesetzt. Dadurch wurde verbliebenes exokrines und lymphatisches Gewebe entfernt. Danach erfolgte die Zählung der Inseln und das Aufteilen in Portionen zu 200 Inseln (ca. 500 IEQ) in 4 ml TCM-199/5% FCS.

Die Präparationen für die „LPS-Gruppe“ und „Zelltrümmer + LPS-Gruppe“ erhielten 10 µl LPS pro ml Kulturmedium. Die Inseln wurden nun über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Kollagenase (Lot-Nr. 09264)	Serva, Heidelberg,
Hank's salt solution	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ciprobay 200	Bayer, Leverkusen
Hepes Buffer, 1 M	Biochrom, Berlin
Histopaque 1077	Sigma, Steinheim
Ficoll separating solution (Charge 059x)	Biochrom, Berlin
Gentamicin 80	Brahms, Wiesbaden
LPS-Lösung (1mg/ml; Serotyp 055:B5)	Sigma, St.Louis
Narcoren	Merial, Hallbergmoos
Ethanol, vergällt, 80%	Klinikumsapotheke
Flowbench LaminAir HA2472	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann
Cenco, Reagenzglasschüttler	Breda, NL
Zentrifuge, Rotana	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge, Rotana TR	Hettich, Tuttlingen
Brutschrank, Cytoperm	Heraeus, Hanau
Flockeneisbereiter, AF 10	Scotsman, Italien
Pipetten, 10, 100, 1000 µl, Pipetman	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickhausen
Sterile und unsterile Mullkompressen	Fuhrmann Verbandstoffe AG, Neunkirchen
Spritzen 5, 10 ml	Braun, Melsungen
Kanülen 0,45 x 12 und 1,2 x 40	Terumo, Leuven
Petrischalen, steril, 94/16 und 60/13 mm	Falcon, Le Pont de Claix
Gewebekulturröhrchen, 10 ml, TC, steril	Greiner, Frickhausen
PP-Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner, Frickhausen

OP-Besteck: Große Schere, Kleine Schere, Chirurgische Pinzette, Anatomische Pinzette, schmale Klemme, steriler Faden, Polyethylen-Katheder (Fa. Braun)



### Viabilitätstests

Um den Gehalt an lytisch beschädigten oder apoptotisch zugrundegehenden Zellen zu ermitteln, wurden die isolierten Langerhans-Inseln mit Trypanblau- und Annexinfärbung untersucht. Die Inseln wurden isoliert, portioniert und mit und ohne Zusatz von 10 µg/ml LPS in 4 ml TCM-199/5% FCS über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### Trypanblautest

Trypanblau ist ein Farbstoff, der Membranen lytisch geschädigter Zellen leicht durchdringt und sich in den Zellen anreichert. Gefärbte Zellen erscheinen unter dem Mikroskop kräftig dunkelblau. Intakte Zellen färben sich nicht an. Bei Zusatz von FCS zum Medium ist Trypanblau selbst nicht zytotoxisch.

20-30 Inseln wurden mit 50 µl TCM-199/5% FCS aus der Petrischale in eine 96-well Flachbodenplatte überführt und mit 10 µl Trypanblau 10 Minuten vorsichtig geschüttelt. Nach anschließender Sedimentation der Inseln und zweimaligem Waschen mit 200 µl TCM-199/5% FCS wurden die Inseln bei 100facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop betrachtet. Der Anteil blau gefärbter, beschädigter Zellen im Verhältnis zu nicht angefärbten Zellen wurde abgeschätzt und der Prozentsatz an vitalen Zellen errechnet.

### Annexintest

Annexin-FITC bindet an Phosphatidylserin, ein Membranprotein, das während des programmierten Zelltodes (Apoptose) auf der Außenseite der Zellmembran zu finden ist. Die mit Annexin gefärbten Zellen erscheinen im UV-Licht grünlich-fluoreszierend.

50 µl Inselsuspension wurde mit 50 µl Annexin-Gebrauchslösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Sedimentieren wurden die Inseln in eine Petrischale mit 5 ml TCM-199/5% FCS überführt. Die Inseln wurden herausgepickt, auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit zugeschaltetem UV-Licht betrachtet. Der Anteil der fluoreszierenden, apoptotischen Zellen wurde im Verhältnis zu den nicht gefärbten vitalen Zellen abgeschätzt und der Prozentsatz der vitalen Zellen errechnet.

## Material und Methoden

---

Schüttelgerät für Platten, Titertek  
Lichtmikroskop mit UV-Lampe  
96-well Rundbodenplatte  
Neubauer-Zählkammer  
Deckgläser  
Annexin-FITC, verdünnt in P/FCS (10 µg in 200 µl)  
Trypanblau 0,4%

Flow Laboratories  
Zeiss, Oberkochen  
Falcon, Le Pont de Claix  
Kühn und Bayer, Nidderau  
Kühn und Bayer, Nidderau  
Serva, Heidelberg  
Merck, Darmstadt

### Insulfunktionstests

Um herauszufinden, ob sich die Inkubation mit LPS auf die Insulinproduktion der Inseln auswirkt, wurden die isolierten Inseln mit Glucoselösung stimuliert und die Insulinsekretion gemessen. Die Inselsuspension wurde zu vier gleichen Teilen in 4 ml TCM-199/5% FCS über 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zweien der Aliquots wurde sofort LPS (10 µg/ml Kulturmedium) zugesetzt. Jeweils ein Teil der Inseln mit und ohne LPS wurde am nächsten Tag mit dem Rat Insulin-ELISA auf Insulinsekretionsfähigkeit getestet.

Die übrigen Inseln wurden nach 24 h gewaschen und in Petrischalen mit frischem Kulturmedium überführt. Diese Inseln wurden 72 h weiterinkubiert, dann ebenfalls auf Insulingehalt und -sekretionsfähigkeit getestet.

Die Lösungen für den Testansatz wurden steril angemischt und bei 4°C aufbewahrt.

#### IRI-Puffer (Puffer zur Bestimmung von immunoreaktivem Insulin)

1l Aqua dest + 7,12 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 6 g NaCl + 3 g RSA (Rinderserumalbumin; Merck, Darmstadt)

#### Stimulationslösungen

Ausgangsmaterial für die verwendeten Stimulationslösungen ist eine speziell hergestellte glucosefreie TCM-199-Charge. Diese wurde mit 0,1% RSA und 20% Glucoselösung zu Stimulationslösungen mit 30 mg/dl Glucose und 300 mg/dl Glucose gemischt.

### Insulinsekretion

Die isolierten, mit bzw. ohne Zusatz von LPS kultivierten Ratteninseln wurden gewaschen und in eine Petrischale mit TCM-199/30 mg/dl Glucose überführt. Nach 30 min Inkubation

## Material und Methoden

---

im 37°C Brutschrank wurde das in dieser Zeit gebildete Insulin durch erneutes Überführen in frisches TCM-199/30 mg/dl Glucose entfernt.

Unter dem Stereomikroskop wurden je 5 Inseln der Größe 150 µm in 10 µl Medium mit der Eppendorf-Pipette aufgepickt und in Plastikreagenzröhrchen überbracht. Jeweils 5 der Röhrchen enthielten 0,5 ml TCM-199/**30**mg/dl Glucose, 5 Röhrchen 0,5 ml TCM-199/**300** mg/dl Glucose. Sie wurden mit Folie abgedeckt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Aus jedem Ansatz wurden 100 µl Überstand abgenommen, in 1 ml IRI-Puffer überführt und geschüttelt. Für den Elisa wurden 25 µl davon verwendet. Der ELISA wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Nach photometrischer Bestimmung der Extinktionswerte wurde anhand der Eichkurve der Insulingehalt in ng/ml errechnet. Dieser wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und so auf die Insulinsekretion eines Inselequivalents hochgerechnet.

### Insulingehalt

Die Inseln und das verbliebene Medium wurden mit dem Ultraschallhomogenisator beschallt, verdünnt und die Suspension ebenfalls mit dem Elisa auf ihren Insulingehalt getestet.

Wasserbad  
Brutschrank, Cytoperm  
Ultraschallhomogenisator Labsonic U  
Pipetten, 10, 100, 1000 µl  
Pipettenspitzen, steril  
Petrischalen, 60 x 15 mm, steril  
Röhrchen 3,5 ml

Rat Insulin ELISA-Kit

Köttermann  
Heraeus, Hanau  
Braun, Melsungen  
Gibco, Frankreich  
Greiner, Frickhausen  
Falcon, New Jersey  
Sarstedt, Nümbrecht

Mercodia, Uppsala

### ***In-vivo-Versuche: Inseltransplantation***

#### **Induktion des Diabetes mellitus mit Streptozotocin**

Der Diabetes mellitus wurde bei C57Bl/6J-Mäusen mit Streptozotocin induziert. Dazu wurden 50 mg Streptozotocin /kg Maus intraperitoneal injiziert. Streptozotocin ist ein Zellgift, das zur selektiven Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas führt.

Mäuse, die am 3. und 4. Tag nach Streptozotocin-Injektion einen Blutglucosegehalt von  $>300$  mg/dl hatten, wurden transplantiert. Mäuse, die keine hohen Blutzuckerwerte zeigten, wurden getötet.

Streptozotocin (Lot 10108)  
Hank's salt solution

Serva, Heidelberg  
Biochrom, Berlin

#### **Glucosebestimmungen**

Blutentnahmen erfolgten jeweils zwischen 8.00 und 10.00 h.

Durch einen Stich in die Schwanzspitze der Maus mit einer Kanüle und Stauen des venösen Abflusses mit Daumen und Zeigefinger trat Blut aus. Dieses wurde in ein Kapillarröhrchen aufgenommen. Das Röhrchen wurde in ein Microtube mit 100  $\mu$ l Uranylacetat verbracht und geschüttelt, so dass das Blut sich im Uranylacetat löste. Nach Zentrifugation des Microtubes bei 15000 U/min wurden 50  $\mu$ l vom Serum abgenommen und der Glucosegehalt anhand einer Eichkurve im Beckman-Glucoseanalysator gemessen.

Zentrifuge, Microliter  
Glucoseanalysator und Zubehör  
Kanüle, 0,45 x 12  
Kapillare zur BZ-Bestimmung  
Microtubes, 1,5 ml  
Uranylacetat

Hettich, Tuttlingen  
Beckman Instruments GmbH, München  
Neolus, Leuven  
Kabe, Nümbrecht  
Sarstedt, Nümbrecht  
Kabe, Nümbrecht

#### **Gewichtsbestimmung**

Vor jeder Blutentnahme wurde die Maus gewogen und der Gewichtsverlauf dokumentiert. Bei einsetzendem Diabetes mellitus nach STZ-Gabe verloren die Mäuse an Gewicht. Als zusätzliches Kriterium bestätigte die Gewichtszunahme die erfolgreiche Transplantation,

## Material und Methoden

---

neuerlicher Gewichtsverlust bestätigte die Abstoßung des Transplantates zusätzlich zum Wiederanstieg der Blutglucose.

### Suspensionen abgetöteter Inseln

Zur Herstellung von Suspensionen abgetöteter Inseln wurden vitale Inseln in Portionen zu 200 Inseln in 100 µl Kulturmedium eingefroren. Sie verblieben mindestens 24 h bei –20°C. Direkt vor Transplantation wurde jeweils eine Portion Inseln aufgetaut und mit TCM-199/5% FCS vorsichtig gewaschen und zentriert. Die Zellverbände waren stark beschädigt, so dass die Inseln bereits durch geringfügige mechanische Belastung teilweise zerfielen. Daher musste beim Zentrieren in der Petrischale sehr behutsam vorgegangen werden. Der Nachweis der vollständigen Abtötung der Inselzellen erfolgte durch Inkubation mit dem Tetrazoniumsalkali MTT. Lebende, nicht aber tote Inseln überführen das hellgelbe MTT in das dunkelblau gefärbte MTT-Formazan, das vitale Inseln nahezu schwarz färbt (Wacks *et al.* 1992).

### Transplantation der Inseln

Die kultivierten Inseln wurden zentriert und mit der Eppendorf-Pipette in 4 ml frisches TCM-199/5% FCS überführt. Danach wurden die Inseln mit 20 µl Medium in eine Hamilton-Microliter-Spritze aufgezogen und zur leicht stumpf geschliffenen Kanüle hin sedimentiert. Tote Inseln wurden aufgetaut, ebenfalls gewaschen und zusammen mit vitalen in die Hamiltonspritze aufgezogen. OP-Besteck und gefüllte Hamiltonspritze wurden bereitgelegt. Die männliche C57Bl/6J-Maus wurde mit Metofane narkotisiert, die linke Flanke wurde rasiert und desinfiziert. Die Maus wurde auf die rechte Seite gelegt. Der operative Zugang erfolgte mittels paravertebralem Schnitt über der rechten Niere. Durch leichten Druck wurde die Niere an die Oberfläche luxiert. Die Hamiltonspritze wurde von dorsal nach ventral vorsichtig bis unter die gegenüberliegende Nierenkapsel gestochen. Die Inseln wurden herausgespritzt und verteilten sich unter der Nierenkapsel. Die Niere wurde mit steril filtrierter physiologischer Kochsalzlösung abgespült und zurückverlagert. Die Wunde wurde mit Muskelnäht und Hautklammern verschlossen, die Hautoberfläche mit Sprühpflaster behandelt.

Microliter syringe  
Metofane  
Flowbench LaminAir HA2472  
Pipetten, 10, 100, 1000 ml, Pipetman  
Pipettenspitzen, steril

Hamilton, Reno, Nevada  
Janssen-Cilag, Neuss  
Heraeus, Hanau  
Gilson, Frankreich  
Greiner, Frickhausen

## Material und Methoden

---

Petrischalen, steril  
Ethanol, vergällt, 80%  
Sterile und unsterile Mullkompressen

Falcon, Le Pont de Claix  
Klinikumsapotheke  
Fuhrmann Verbandstoffe AG, Neunkirchen

OP-Besteck: Große Schere, Kleine Schere, Chirurgische Pinzette, Anatomische Pinzette, schmale Klemme, steriler Faden, Polyethylen-Katheder (Fa. Braun)

## Klassifikation der Versuchsgruppen

Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet, die jeweils das aufgeführte Material transplantiert bekamen:

„Kontrollgruppe“	200 vitale Inseln
„LPS-Gruppe“	200 vitale, mit LPS inkubierte Inseln
„Zelltrümmer-Gruppe“	200 vitale + 200 abgetötete Inseln
„Zelltrümmer +LPS-Gruppe“	200 vitale LPS-Inseln + 200 abgetötete Inseln

## Interpretation der gemessenen Blutglucosewerte

Als Normoglycämie wurde eine Blutglucosekonzentration von kleiner oder gleich 150 mg/dl definiert. Zwischen 151 und 299 mg/dl wurde gestörter Glucosestoffwechsel angenommen. Als Hyperglycämie wurde ein Glucosemesswert von mindestens 300 mg/dl bezeichnet. Fiel der Blutglucosewert nach Transplantation auf 150 mg/dl oder weniger, definierte dies die erfolgreiche Transplantation. Ein Transplantat galt als abgestoßen, wenn der Blutzuckerwert nach Transplantation und erfolgter Rückkehr in den normoglycämischen Bereich wieder über 151 mg/dl und an drei aufeinanderfolgenden Tagen über 300 mg/dl stieg.

## *Auswertung der Messergebnisse*

Die gemessenen Blutzuckerkonzentrationen wurden zunächst in für jedes Tier separat angelegten Tabellen festgehalten. Nach Abschluss des Versuches wurden die Messwerte in Excel-Tabellen übertragen. Die Auswertung aller Messdaten erfolgte mit dem Statistikprogramm Instat 2.0 für MacIntosh, die Grafiken wurden mit DeltaGraph®3.5 für Macintosh erstellt.

## Ergebnisse

### *Nachweis der Aktivität der verwendeten Endotoxin-Charge*

Durch Zusatz von LPS konnte ein Ansteigen des NO-Gehaltes im Kulturmedium von aktivierten C57Bl/6J-Milzleukozyten im Vergleich zu Kontrollansätzen nachgewiesen werden.

Beim statistischen Vergleich der Messwerte aus den unterschiedlichen Ansätzen mit dem Man-Whitney-Test ergab sich ein sehr signifikanter Unterschied ( $p=0,0002$ ) für 2, 3 und  $4 \times 10^6$  Zellen mit/ ohne Zusatz von LPS zur Kultur. (Tab. 1)

#### Tabelle 1:

*Nachweis der Aktivität der verwendeten LPS-Charge anhand der NO-Bestimmung im Kulturmedium von Maus-Milzleukozyten*

Zellen/ well	Kontrollansatz	LPS-Ansatz	Signifikanz
$1 \times 10^6$	$0,55 \pm 0,17^{(1)}$	$0,63 \pm 0,18^{(1)}$	n.S. ( $p = 0,2786$ )
$2 \times 10^6$	$0,78 \pm 0,13^{(1)}$	$1,43 \pm 0,07^{(1)}$	* ( $p = 0,0002$ )
$3 \times 10^6$	$1,03 \pm 0,07^{(1)}$	$3,41 \pm 0,20^{(1)}$	* ( $p = 0,0002$ )
$4 \times 10^6$	$1,59 \pm 0,11^{(1)}$	$7,90 \pm 0,32^{(1)}$	* ( $p = 0,0002$ )

<sup>(1)</sup> nmol NO/ml Überstand

Erwartungsgemäß wurde beobachtet, dass Zusatz von LPS zum Kulturmedium die Nitritproduktion der Makrophagen anregte (Zhang und Morrison 1993). Damit wurde die biologische Wirksamkeit der verwendeten LPS-Charge auf Zellen des als Inselempfänger verwendeten Mäusestammes bestätigt.

Auffällig war, dass offenbar eine bestimmte Zellkonzentration gewährleistet sein musste, um einen deutlichen Anstieg von NO hervorzurufen. Ein analoger Befund wurde für die IL-1 $\beta$ -induzierte NO-Synthese in B-Zell-Suspensionen beschrieben, die auch erst ab einer gewissen Zelldichte auftrat (Hoorens *et al.* 2001) Dieser Effekt ist keine Frage der Messempfindlichkeit.

### ***Endotoxingehalt von Isolations- und Kulturmedien***

Bei der Auswahl der Medien wurde auf ausgesucht endotoxinarme Chargen geachtet. Der LPS-Gehalt von Isolations- und Kulturmedien ist in Tab. 2 aufgeführt.

Tabelle 2:

*LPS-Gehalt der zur Isolation, Reinigung und Kultur verwendeten Chemikalien*

<i>Chemikalie</i>	<i>LPS-Gehalt</i>
Destilliertes Wasser	< Nachweisgrenze*
Hanks salt solution	< Nachweisgrenze*
Histopaque	< Nachweisgrenze*
Ficoll Charge 059x	< Nachweisgrenze*
TCM-199/5% FCS	0,010 ng/ml
Kollagenase Lot 09264	0,200 ng/mg

\*: Nachweisgrenze = 0,002 ng/ml

In anderen Kollagenasen wurde bis zu 7000 ng/mg Endotoxin gefunden (Jahr *et al.* 1999b). Der Endotoxingehalt des TCM-199/5% FCS resultiert aus dem fetalen Kälberserum. Von verschiedenen vom Hersteller (Biochrom) als „endotoxinarm“ deklarierten FCS-Chargen wurde das mit dem niedrigsten Endotoxingehalt ausgewählt. Ein völlig endotoxinfreies FCS war nicht erhältlich. Die Ficoll-Charge 059x enthielt nur geringe Mengen an LPS im Gegensatz zu anderen Chargen des gleichen Herstellers, die ebenfalls die gleiche Bestellnummer hatten.

### ***LPS-Gehalt kultivierter Langerhans-Inseln***

Die LPS-Bestimmung an jeweils 200 isolierten, kultivierten, in NaCl gewaschenen Ratteninseln ergab die in Tab.3 aufgeführten Werte.



## Ergebnisse

Tabelle 3:

*Absolutmenge LPS in Suspensionen von isolierten, mit und ohne LPS über 24h kultivierten Inseln*

<i>Protokoll</i>	<i>LPS-Menge absolut</i>
Frisch isolierte Inseln	0,0015 ng
Ohne LPS kultivierte Inseln	0,0006 ng
Mit LPS kultivierte Inseln	19,2000 ng

Damit und unter Berechnung von 20 µl transplantierten Mediums (TCM-199/5% FCS mit einem Eigengehalt an LPS von 0,010 ng/ml) und transferierten LPS aus der Kulturschale der LPS-haltigen Gruppen ergibt sich die hier aufgeführte LPS-Menge, wie sie mit den Inseln unter die Nierenkapsel einer Maus transplantiert wurde (Tab.4).

Tabelle 4:

*Errechnete, absolut transplantierte LPS-Menge pro Versuchsgruppe*

<i>Gruppe</i>	<i>LPS-Gehalt pro Transplantat</i>
Kontrollgruppe	0,0008 ng
LPS-Gruppe	19,2002 ng
Zelltrümmer-Gruppe	0,0014 ng
Zelltrümmer-LPS-Gruppe	19,2008 ng

## ***In-vitro-Versuche mit kultivierten Langerhans-Inseln***

### **Viabilität im Annexin- und Trypanblautest**

Die zur Transplantation verwendeten Inseln wiesen im Trypanblautest durchgängig eine Viabilität von über 95% auf. Inseln, die ohne, und Inseln, die mit LPS inkubiert worden waren, unterschieden sich nicht in der Viabilität.

Auch im Annexintest wurde eine Inselviabilität von allseits über 95% festgestellt, auch hierbei fand sich kein Unterschied der LPS-inkubierten Inseln im Vergleich zum Kontrollansatz.

## Ergebnisse

### Inselfunktion kultivierter Langerhans-Inseln

Es wurde überprüft, ob die Zugabe von LPS zum Kulturmedium die Fähigkeit der Inseln beeinträchtigt, Insulin zu produzieren und zu sezernieren. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass transplantierte Inseln, die LPS erhalten haben, eine schlechtere Qualität aufweisen und somit den Blutglucosewert nicht in dem Maße senken können wie Kontrollinseln. Die Kultur erfolgte in TCM-199/5% FCS mit einem Glucosegehalt von 100 mg/dl. Die Akutstimulation erfolgte in Medien mit einem Glucosegehalt von 30 mg/dl, respektive 300 mg/dl.

### Insulinsekretion

Einen Tag in TCM 199/ FCS kultivierte Inseln zeigten geringfügig, aber nicht signifikant höhere Sekretionswerte als in TCM 199/ FCS *mit* LPS kultivierte Inseln (Tab.4).

Tabelle 4:

*Insulinsekretion isolierter Langerhans-Inseln, 24h Kultur, ±Zusatz von LPS*

	<i>n=</i>	<i>Stimulationsmedium 30</i>	<i>Stimulationsmedium 300</i>
Kontrollgruppe	5	0,02 ± 0,01 <sup>(1)</sup>	4,82 ± 0,54 <sup>(1)</sup>
LPS-Gruppe	5	0,10 ± 0,04 <sup>(1)</sup>	4,18 ± 0,47 <sup>(1)</sup>
Signifikanzprüfung		n.S. (p= 0,222)	n.S. (p= 0,548)

<sup>(1)</sup> Die Sekretionswerte sind angegeben in ng Insulin / Insel / 90 min

Die Sekretionsprüfung von einen Tag in TCM 199/ FCS mit LPS kultivierter Inseln, die dann gewaschen, in LPS-freies TCM 199/ FCS überführt und drei Tage weiterkultiviert wurden ergab sogar signifikant höhere Insulinsekretionswerte als die der Inseln, welche ohne LPS kultiviert worden waren (Tab.5). Insgesamt war die Insulinsekretion nach insgesamt 4 Tagen in Kultur deutlich erniedrigt im Vergleich zu den Werten nach Kulturdauer von einem Tag.

## Ergebnisse

Tabelle 5:

*Insulinsekretion isolierter Langerhans-Inseln. 24h Kultur  $\pm$  Zusatz LPS, Weiterkultur 72h ohne LPS*

	<i>n=</i>	<i>Stimulationsmedium 30</i>	<i>Stimulationsmedium 300</i>
Kontrollgruppe	5	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>(1)</sup>	0,97 $\pm$ 0,11 <sup>(1)</sup>
LPS-Gruppe	5	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>(1)</sup>	1,69 $\pm$ 0,11 <sup>(1)</sup>
Signifikanzprüfung		n.S. (p = 0,841)	* (p = 0,0079)

<sup>(1)</sup>Die Sekretionswerte sind angegeben in ng Insulin / Insel / 90 min

Die Fähigkeit der isolierten, kultivierten Inseln Insulin zu sezernieren wurde durch Zugabe von LPS zum Kulturmedium nicht beeinträchtigt. Die Insulinsekretion war nach vier Tagen sogar signifikant besser als die der Kontrollgruppe ohne LPS.

### Insulingehalt

Mit dem Test auf Insulingehalt sollte ausgeschlossen werden, dass mit LPS in Berührung gekommene Inseln weniger Insulin enthalten als Kontrollinseln. Die Kultur erfolgte in TCM-199/5% FCS mit einem Glucosegehalt von 100 mg/dl. Die Stimulation erfolgte in Medien mit einem Glucosegehalt von 30 respektive 300 mg/dl.

Einen Tag mit LPS in TCM 199/ FCS kultivierte Inseln unterschieden sich nicht signifikant von Inseln, die ohne LPS inkubiert worden waren (Tab. 6).

Tabelle 6:

*Insulingehalt isolierter Langerhans-Inseln, Kultur 24 h,  $\pm$  Zusatz LPS*

	<i>n=</i>	<i>Stimulationsmedium 30</i>	<i>Stimulationsmedium 300</i>
Kontrollgruppe	4	32,20 $\pm$ 5,04 <sup>(1)</sup>	30,52 $\pm$ 4,20 <sup>(1)</sup>
LPS-Gruppe	4	33,32 $\pm$ 2,80 <sup>(1)</sup>	37,52 $\pm$ 3,64 <sup>(1)</sup>
Signifikanzprüfung		n.S. (p = 0,999)	n.S. (p = 0,343)

<sup>(1)</sup>ng Insulin / Insel

Einen Tag mit LPS, dann ohne LPS weiterkultivierte Inseln hatten signifikant höhere Insulingehalte als einen Tag und drei weitere Tage ohne LPS kultivierte Inseln. Auffällig war ein Absinken des Insulingehaltes beider Ansätze um etwa die Hälfte des Ausgangswertes (Tab. 7).

## Ergebnisse

Tabelle 7:

*Insulingehalt isolierter Langerhans-Inseln, Kultur 24 h, ± Zusatz LPS, 72h Weiterkultur ohne LPS*

	<i>n=</i>	<i>Stimulationsmedium 30</i>	<i>Stimulationsmedium 300</i>
Kontrollgruppe	4	13,44 ± 1,40 <sup>(1)</sup>	12,88 ± 0,56 <sup>(1)</sup>
LPS-Gruppe	4	15,68 ± 1,68 <sup>(1)</sup>	16,24 ± 0,28 <sup>(1)</sup>
Signifikanzprüfung		n.S. (p = 0,486)	* (p = 0,029)

<sup>(1)</sup>ng Insulin / Insel

### **Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro-Inselfunktionsprüfung**

Die Kultur isolierter Langerhans-Inseln mit Zusatz von LPS beeinträchtigt weder die Insulinsekretion noch den Insulingehalt. LPS-Inseln wiesen gleiche oder sogar bessere Funktionsdaten auf als ohne LPS kultivierte Inseln. Die *in-vitro* erhaltenen Daten geben keinen Anlass zur Vermutung, dass Inseln, weil sie mit LPS in Kontakt gekommen sind, den Blutzucker schlechter senken können sollten.

Das Phänomen des verminderten Insulingehaltes nach mehreren Tagen in Kultur ist sowohl aus der Literatur als auch aus anderen Untersuchungen des Gießener Labors bekannt.

### ***In-vivo-Versuche: Transplantation kultivierter Langerhans-Inseln***

#### **Blutglucosemonitoring**

Den typischen Verlauf des Blutglucosemonitorings von STZ-diabetischen, dann mit Ratteninseln transplantierten C57Bl/6J-Mäusen zeigt Abb. 1 am Beispiel von Tieren der Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

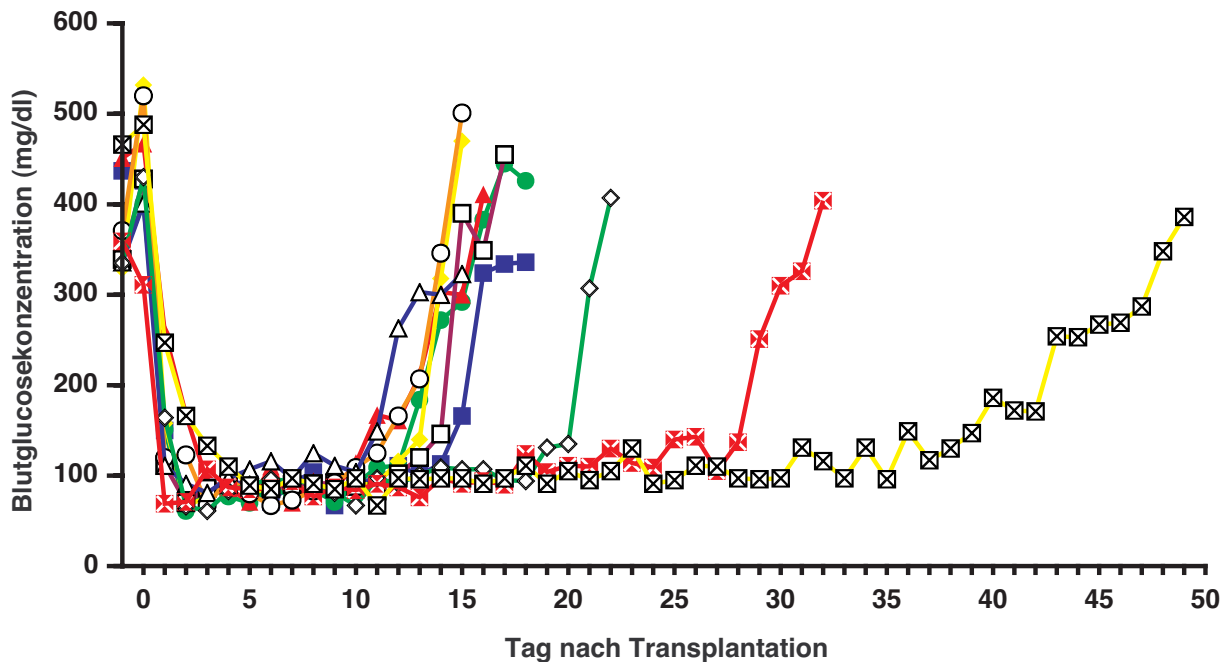


Abb.1: Blutglucosemesswerte der Kontrollgruppe. Deutlich erkennbar sind das Abfallen der Glucosewerte innerhalb weniger Tage nach Transplantation, das Verbleiben im normoglycämischen Bereich für einige Tage, und der anschließende Wiederanstieg nach Abstoßen des Inseltransplantates. In allen Versuchsgruppen wurden ähnliche Verläufe beobachtet.

## Überlebenszeiten der Transplantate

Als Überlebenszeit der Transplantate wurde der Zeitraum zwischen dem Tag der Transplantation und dem Tag der Abstoßung, an dem die Blutglucose erstmalig wieder über 300 mg/dl stieg, gewertet.

*Tabelle 8:*

*Überlebenszeit der Inseltransplantate in den Versuchsgruppen*

	n=	Tag der Abstoßung	Mittelwert +/- SEM
1. Kontrolle	10	11,12,12,13,14,14,15,21,29,40	18,1 +/- 2,9
2. LPS	9	10,12,12,12,14,16,20,22,41	17,7 +/- 3,2
3. Zelltümmer	8	9,13,20,20,23,23,33,47	23,5 +/- 4,2
4. Zelltrümmer+LPS	8	11,13,13,14,15,24,30,31	18,9 +/- 2,9

## Ergebnisse

---

Bei der statistischen Prüfung mit dem Man-Whitney-Test konnten zwischen den Mittelwerten der Überlebenszeit der Transplantate, gemessen am Tag der Abstoßung, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Zur besseren Anschaulichkeit sind die Mittelwerte mit SEM noch einmal in Abb.2 dargestellt

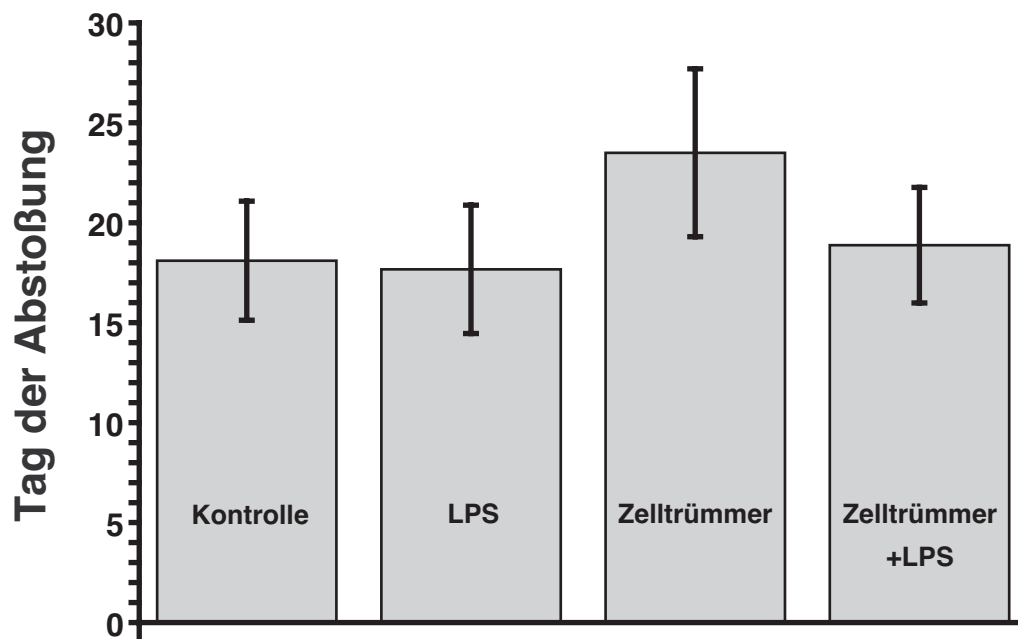


Abb.2: Mittelwerte und SEM des Tags der Abstoßung für die einzelnen Versuchsgruppen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

## Diskussion

### **Kein Einfluss von Zelltrümmern und LPS-Kontamination auf die Abstoßung von Inseltransplantaten**

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die Transplantatabstoßung langerhansscher Inselzellen durch absichtliche Beimengung von Zelltrümmern aus abgetöteten Inseln und Verunreinigung mit LPS beschleunigt werden kann. Es wurde die Ratte-in-Maus-Xenotransplantation (Lewis-Ratte in C57Bl/6J-Maus) gewählt, weil von diesem Modell eine relativ lange Zeit bis zur Abstoßung bekannt ist (10-14 Tage), so dass eine eventuelle Verkürzung der Überlebenszeit gut untersucht werden kann. Da die Immunaktivierung bei diesem Modell mit der allogenen Immunaktivierung voll vergleichbar ist (Hirota *et al.* 1997), können für die Allotransplantation relevante Ergebnisse erwartet werden.

Vor Beginn der Transplantationsserien wurde geprüft, ob mittels Kollagenasedigestion und anschließender Reinigung auf Dichtegradienten isolierte Inseln ausreichend vital sind. Trypanblau- und Annexintest ergaben eine Viabilität von durchgehend >95%. Die Inselfunktion wurde mit Stimulationstests (Insulinsekretion, Insulingehalt) überprüft. Die In-vitro-Versuche zeigten, dass die Kontrollinseln und auch die mit LPS vorinkubierten Inseln von ausgezeichneter Qualität waren.

In vivo wurde daraufhin getestet, ob isolierte Inseln aus Lewis-Ratten den Blutzucker von mit Streptozotozin diabetisch gemachten C57Bl/6J-Mäusen senken können. Es wurde ein Überschuss an Inseln transplantiert (200 vitale Inseln/Maus), d.h. mehr Inseln, als zur Senkung der Blutglucose notwendig gewesen wären. Nach den Erfahrungen des Gießener Insellabors sind die mindestens erforderliche, „marginale“ Inselmasse 50 Inseln.

Alle in diesen Versuch eingeschlossenen Tiere reagierten auf die Inseltransplantation mit Senkung des Blutglucosewertes von initial >300 mg/dl auf Normalwerte <150 mg/dl. Durch die Dokumentation der gleichzeitig aufgetretenen Gewichtszunahme wurde ausgeschlossen, dass die Blutzuckersenkung ein Effekt verminderter Nahrungsaufnahme (z.B. durch schlechten Allgemeinzustand nach dem Transplantationseingriff) sein könnte. Die Tiere blieben über einen Zeitraum normoglycämisch, stießen dann aber das Transplantat ab, was am

## Diskussion

---

Wiederanstieg des Blutglucosewertes erkannt wurde. Spontane Akzeptanz der Inseln länger als 50 Tage, wie sie bei Jahr *et al.* 1999 gesehen worden war, wurde in dieser Serie nicht beobachtet, auch nicht in der Kontrollgruppe. Die Gründe für diese Differenz sind unbekannt.

Ausgehend von der „Alarmtheorie“ waren für Zelltrümmer und LPS-kontaminierte Inseln verstärkte proinflammatorische Eigenschaften angenommen und somit erwartet worden, dass der Zeitraum bis zur Abstoßung in der LPS-, Zelltrümmer-, und der Zelltrümmer + LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe stark verkürzt sein könnte.

Es wurden jedoch nur leichte Unterschiede des Zeitraums bis zur Abstoßung beobachtet, überraschenderweise sogar eher im Sinne einer Verlängerung. Im statistischen Vergleich der Mittelwerte/SEM ergaben sich jedoch keine signifikanten Differenzen.

Daraus folgt, dass Verunreinigungen mit LPS und Zelltrümmern die Abstoßung von Langerhans-Inseltransplantaten im Ratte-in-Maus-Modell nicht beschleunigen.

## *Interpretation der Ergebnisse*

Im Vergleich zu den Gruppen, die verunreinigte Transplantate erhalten hatten, zeigte die Kontrollgruppe keine längere Überlebenszeit des Transplantats. Es bleibt zu erläutern, welche Ursachen dieser Beobachtung zugrunde liegen könnten.

Es ist zu überlegen, ob bereits in der Kontrollgruppe eine hohe Ausgangsimmunität durch unvermeidbare Folgen von Vorgängen bei der Inselgewinnung und Transplantation bestand, die durch die Zugabe von LPS und Zelltrümmern in den Versuchsgruppen nicht mehr gesteigert werden konnte. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass eventuell die Mengen an LPS und Zelltrümmern in den Versuchsgruppen zur Auslösung eines Effektes im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ausreichten.

Selbst bei Verwendung ausgesucht endotoxinarmer Kollagenase und Chemikalien zur Isolation fand eine Kontamination der Inseln mit geringen Mengen an LPS statt. Möglich wäre, dass die nachgewiesene, niedrige Menge in einen Tag kultivierten Inseln, wie sie für die Kontrollgruppe verwendet wurden (0,8 pg/200 Inseln), bereits eine Immunreaktion auslösen konnte. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich. Um die Kontamination der Inseln während der Isolation komplett auszuschließen, wären *absolut* endotoxinfreie Materialien notwendig,



## Diskussion

---

solche Materialien (Kollagenase, FCS) sind jedoch kommerziell nicht erhältlich. Selbst für die Isolationsvorgänge bei humanen Inseln verwendete Liberase ist nur nahezu endotoxinfrei.

Andererseits könnte vermutet werden, dass die Menge an Endotoxin in der „LPS“- und der „LPS + Zelltrümmer“-Gruppe nicht ausgereicht haben könnte, um einen Effekt früherer Abstoßung verglichen mit der Kontrollgruppe hervorzurufen. Allerdings ist die Menge an LPS mit ca. 20ng/Transplantat um viele Größenordnungen höher im Vergleich zur Kontrollgruppe mit etwa 0,8pg/Transplantat. Die Inseln konzentrieren sich im winzigen Raum unter der Nierenkapsel, so dass die Menge an LPS zur lokalen Beeinflussung der APC und damit der Aktivierung des Immunsystems auf jeden Fall ausreichen sollte. Ein Modell mit zusätzlich ins Transplantat appliziertem LPS in höherer Konzentration (z.B. 1µg/Transplantat) könnte möglicherweise einen Unterschied der Transplantatüberlebenszeiten hervorrufen. Allerdings werden Kontaminationen mit solchen Konzentrationen an LPS bei unter klinischen Bedingungen ausgeführter Isolation, Separation und Kultur selbst dann nicht erreicht werden, wenn mit Endotoxin verunreinigte Materialien verwendet werden. Dieses Modell würde eine rein hypothetische Situation untersuchen.

Zellschädigung bei der Konservierung der Organe und Gewinnung der Inseln könnte zur Induktion von Alarmsignalen führen, da lytisch geschädigte Zellen vom Immunsystem als Indikatoren einer Gefahr angesehen werden (Gallucci *et al.* 1999). Das artifizielle Phänomen der Organtransplantation kann nicht von einer wahrscheinlicheren, mikrobiellen Zellschädigung differenziert werden. Ob auch apoptotisch zugrunde gehende Zellen Alarmsignale induzieren können, ist umstritten (Galucci *et al.* 1999; Berney *et al.* 2001). Diese These soll daher hier nicht weiter verfolgt werden.

Unter optimalen Bedingungen wird bei gut präparierten Nagerinseln der überwiegende Anteil der ohnehin wenigen lytischen Inselzellen während der Kulturperiode eliminiert, so dass eine Generation von Alarmsignalen durch bereits in-vitro vorgeschädigte Inseltransplantate ausgeschlossen sein sollte.

Es ist allerdings bekannt (Davalli *et al.* 1995 und 1996), dass nur ein Teil der Inseln in der frühen Phase nach Transplantation tatsächlich anwächst („Engraftment“), während ein erheblicher Teil des transplantierten Gewebes z.B. durch Hypoxie (isolierte Inseln sind nicht mehr primär vaskularisiert) geschädigt wird. Im Gießener Insellabor wurde gezeigt, dass eine

## Diskussion

---

Anzahl von lediglich 50 unter identischen Bedingungen transplantierten Inseln ausreichte, um die Blutglucose von STZ-diabetischen C57Bl/6J-Mäusen zu normalisieren (Eckhardt *et al.* 1999). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die meisten Inselzellen die frühe Periode nach Transplantation überleben und tatsächlich funktionieren.

Trotzdem muss in Betracht gezogen werden, dass bei den vorliegenden Versuchen in den Transplantaten der Kontrollgruppe durch die Umstände in der frühen Phase nach Transplantation zumindest einige tote Zellen entstanden. Dies, obwohl die Inseln *in vitro* eine ausgezeichnete Qualität aufgewiesen hatten, und obwohl die Technik der Transplantation unter die Nierenkapsel mittels Dispersion auf der Nierenoberfläche die Zellzerstörung durch Hypoxie für die Inseln vermindern soll. Die hypoxische Schädigung kann nie völlig ausgeschlossen werden. Die möglicherweise entstandene geringe Menge an lytischem Zellmaterial hat in diesen Versuchen vielleicht ausreichend Alarmsignale für die Aktivierung des Immunsystems bereitstellen können. In diesem Fall kann durch Zusatz von weiteren Zelltrümmern keine zusätzliche Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit erwartet werden.

Das wesentliche Argument gegen das Vorliegen einer hohen Ausgangsimmunität im Kontrollversuch, die dann durch LPS und/oder Zelltrümmer nicht weiter gesteigert werden kann, ist der insgesamt gesehen für eine Transplantation zwischen genetisch nicht verwandten Spendern und Empfängern recht lange Zeitraum bis zur Rejektion. Bei den Kontrolltieren erfolgte die Abstoßung im Mittelwert erst nach 18 Tagen, also deutlich später, als dies für die Allotransplantation anderer Organe der Fall ist (Rejektion nach etwa einer Woche). Die direkte Antigenpräsentation ist bei der Kombination Maus/Ratte voll intakt (zwischen Ratte und Maus besteht im Unterschied etwa zur Kombination Mensch/Maus volle Kompatibilität der biologischen Wirkung der für die Immunaktivierung nötigen Kofaktoren und Zytokine (Hirota *et al.* 1997)). Daher wäre eine wesentlich schnellere Rejektion als erst nach 18 Tagen zu erwarten, wenn bei den Kontrolltransplantationen bereits viele „Alarmsignale“ aktiv wären.

Insgesamt wird festgestellt, dass die hier vorgestellten Transplantationsergebnisse anders ausfallen, als nach der weitgehend akzeptierten „Alarmtheorie“ (Matzinger *et al.* 1994, Halloran *et al.* 1997, Gallucci *et al.* 2000) zu erwarten war. Über die Ursache kann spekuliert werden, wobei das Argument in Betracht gezogen werden sollte, dass proinflammatorische Signale wie LPS und Zelltrümmer zwar auf der einen Seite über Alarmsignale wie z.B.

## Diskussion

---

aktivierte Komplementkomponenten zu einer Aktivierung des Immunsystems beitragen, auf der anderen Seite aber auch die durch LPS und Zelltrümmer ausgelöste Produktion inflammatorischer Mediatoren (insbesondere freie Sauerstoffradikale und Stickoxid) zu einer Herunterregulation sowohl der MHC-Expression (Gruner *et al.* 1986, Sicher *et al.* 1995) als auch von Kostimulatormolekülen führen kann. Schlussendlich könnten diese beiden gegenläufigen Effekte sich zumindest teilweise gegenseitig aufheben, was zu nahezu unveränderten Rejektionszeiten führen könnte, wie sie bei diesen Versuchen vorgefunden wurden.

## *Praktische Konsequenzen*

Unabhängig von den theoretischen Überlegungen wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass weder Zelltrümmer, noch LPS im Inseltransplantat die Abstoßung wesentlich beschleunigen.

Humane Inselpräparationen enthalten immer eine gewisse Menge toten endokrinen und exokrinen Materials, da wegen der großen benötigten Inselmasse (>300.000 Inseln) eine Reinigung durch Handverlesen nicht möglich ist. Weitere Reinigungsschritte über zusätzliche Zentrifugation auf Dichtegradienten oder Versuche, tote Inseln von vitalen zu trennen, führen jedoch unausweichlich zu beträchtlichen Verlusten an endokrinem Gewebe. Bei der gegebenen Knappheit an Spenderorganen und dem zur Zeit noch bestehenden Mangel an Alternativen zu humanem Spenderpankreas (ungelöste Problematik der Xenotransplantation und In-vitro-Generierung von  $\beta$ -Zellen) bedeutet dies, dass die geforderte Inselmenge (gute Ergebnisse wurden ab 6000 ENI/kg Empfängergewicht erreicht, Brendel *et al.* 1999) unter deutlich schwierigeren Bedingungen gewonnen werden müsste. Klinisch hat sich gezeigt, dass geringfügige Verunreinigungen mit exokrinem Material gut vom Patienten toleriert werden.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Versuche deuten darauf hin, dass die Verluste endokrinen Gewebes durch weitere Reinigung von totem endokrinem Material de facto nicht durch den Vorteil einer verbesserten immunologischen Akzeptanz aufgewogen werden.

Komplex stellt sich die Situation bei der Kontamination der Inseln mit Endotoxin dar. Bei Tierversuchen, bei denen die Transplantation einer marginalen Inselmasse vorgenommen wurde, zeigte sich, dass eine höhere Anzahl von Inseln zur Normalisierung der

## Diskussion

---

Blutglucosewerte Streptozotozin-diabetischer C57Bl/6J-Mäuse notwendig waren, wenn die transplantierten Inseln mit großen Mengen von LPS kontaminiert waren. Die Menge des wiedergefundenen Insulins im Transplantat war deutlich niedriger und auch die metabolische Effizienz von LPS-Inseln war geringer als die der Kontrollgruppe (Eckhardt *et al.* 1999).

Die Daten aus den hier vorliegenden Versuchen zeigen, dass bei Transplantation eines *Überschusses* an Inseln die Überlebenszeit des Transplantates durch Kontamination mit LPS nicht verkürzt wird, und somit davon ausgegangen werden kann, dass die Immunogenität der Inseln durch LPS nicht steigt. Weil die Verfügbarkeit einer ausreichenden Anzahl von Inseln ein ungelöstes Problem darstellt, wird somit die Empfehlung gegeben, Endotoxin in der humanen Inselpräparation weitgehend zu vermeiden, um die Anzahl der zur suffizienten Kontrolle der Blutglucose benötigten Inseln nicht unnötig heraufzusetzen. Eine Verbesserung der immunologischen Abstoßungsproblematik kann jedoch - im Gegensatz zu den ursprünglichen Vorstellungen - durch endotoxinfreie Präparation nicht erwartet werden.

## Zusammenfassung

Das Ziel der Therapie des Diabetes mellitus ist es, Spätschäden vorzubeugen. Dazu soll der Blutzuckerspiegel im normalen Bereich bleiben, ohne dass der Diabetiker dabei das Risiko hypoglykämischer Entgleisungen in Kauf nehmen muss. Dieses Ziel wird von den derzeit angewandten Therapiemethoden (konventionelle und intensivierte Insulintherapie, Insulinpumpentherapie) häufig nicht erreicht. Der biologische Ersatz des geschädigten Inselapparates z.B. durch Inseltransplantation scheint hier eine Lösung bereitzuhalten. Derzeit ist aber das Problem der Abstoßung des transplantierten Gewebes, das größer als bei Transplantation anderer Organe (z.B. Niere oder ganzes Pankreas) zu sein scheint, noch nicht vollständig gelöst (Hering und Ricordi, 1999). Deshalb wird einerseits nach verbesserten immunsuppressiven Protokollen gesucht (Shapiro et al. 2000), andererseits versucht, die Immunogenität der Inseln durch spezielle Isolations- und Kulturbedingungen herabzusetzen.

Die Versuche dieser Arbeit wurden unternommen, um zu überprüfen, ob Zellschäden oder Kontamination mit LPS die Zeit bis zur Abstoßung von Inseltransplantaten verkürzen, weil sie eventuell die Immunogenität der Transplantate erhöhen könnten.

Zellschäden stehen bei anderen Transplantaten (Halloran et al. 1997) im Verdacht, immunogen zu wirken und die Abstoßungsreaktion herbeizuführen. LPS ist ein potenter proinflammatorischer Bestandteil gramnegativer Bakterienzellmembranen. LPS kann in den zur Inselisolierung verwendeten Chemikalien (Kollagenase, Ficoll) in erheblichen Konzentrationen vorkommen und ist durch Waschvorgänge oder längere Kultur nicht mehr vollständig zu entfernen (Linetsky *et al.* 1998, Jahr *et al.* 1999b). Für die humane Inseltransplantation werden ausgesucht endotoxinarme Isolations- und Kulturmedien verwendet. In Versuchen unseres Labors (Eckhard, Promotionsschrift eingereicht, 2001) wurde gezeigt, dass LPS das Engraftment einer marginalen Menge transplanterter Inseln verschlechtert und eine größere Masse Inselgewebe zur Senkung der Blutglucose benötigt wird.

Bei in-vitro -Versuchen (Gallucci et al. 1999) vermochte die Kombination von abgetöteten Zellen (Fibroblasten) und LPS besonders potent die Aktivierung von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen anzuregen

## Zusammenfassung

---

Als Modell für die Versuche zur Überprüfung der These, dass die Kontamination von Inseltransplantaten mit LPS und Zelltrümmern die Immunogenität heraufsetzt und die Abstoßung beschleunigt, wurde die Ratte-in-Maus-Inseltransplantation gewählt. Diese weist spontane Akzeptanz der Inseln für zumindest zwei Wochen auf, und eine Beschleunigung der Abstoßungsreaktion anhand Transplantatversagens sollte sich gut beobachten lassen. Als Messwert diente die Blutglucosekonzentration. Die Überlebenszeit des Transplantats wurde in Tagen bis zum Wiederanstieg der Blutglucose gemessen.

Durch Kollagenasedigestion, Dichtegradientenzentrifugation, Handverlesen und 24 h-Kultur gewonnene Inseln aus Lewis-Ratten wurden transrenal unter die Nierenkapsel von streptozotozin-diabetischen C57Bl/6J-Mäusen transplantiert.

Für die Versuche wurden folgende Gruppen gebildet, die das jeweils aufgeführte Material transplantiert bekamen:

„Kontrollgruppe“	200 vitale Inseln
„LPS-Gruppe“	200 vitale Inseln, Zusatz von LPS zum Medium
„Zelltrümmer“	200 vitale Inseln + 200 abgetötete Inseln
„Zelltrümmer + LPS-Gruppe“	200 vitale LPS-Inseln + 200 abgetötete Inseln

Es wurde erwartet, dass die Gruppen 2, 3 und 4 schneller abstoßen als die Kontrollgruppe.

Entgegen den genannten theoretischen Überlegungen wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass weder Zelltrümmer, noch LPS-Verunreinigung, noch die Kombination beider Faktoren die Abstoßung von Inseltransplantaten wesentlich beschleunigen (keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der Tage der Abstoßung zwischen den Gruppen).

Von einer niedrig gehaltenen LPS-Konzentration in zur Inselgewinnung verwendeten Chemikalien ist somit zwar eine Verminderung der zum initialen Transplantationserfolg notwendigen Inselmasse, aber keine direkte Verbesserung der Abstoßungsproblematik zu erwarten. Auch die Anwesenheit eines Anteils toter Inselzellen in den Inselpräparationen kann nicht für die im Vergleich zur Transplantation anderer Organe verstärkte Abstoßung langerhansscher Inseln verantwortlich gemacht werden.

# Literaturverzeichnis

American Diabetes Association. Pancreas Transplantation for Patients with Diabetes Mellitus. Diab Care 1996; 19: 1668-72

Benoist C, Mathis D. Cell Death Mediators in Autoimmune Diabetes - No Shortage of Suspects. Cell 1997; 89: 1-3

Berney T, Damaris Molano R, Cattani P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R, Ricordi C, Inverardi L. Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra islet cytokine production and islet cell apoptosis. Transplantation 2001; 71: 125-132

Bland B, International Pancreas Transplant Registry. Newsletter 2000; 1-24

Brandhorst H, Brandhorst D, Brendel MD, Hering BJ, Bretzel RG. Assessment of Intracellular Insulin Content During All Steps of Human Islet Isolation Procedure. Cell Transplantation 1998; 7: (5) 489-495

Braun K, Noack U, Führer K, Jahr H. Induction of nitric oxide synthesis in rodent macrophages after partial pancreatectomy. Immune consequences of trauma, shock and sepsis- mechanisms and therapeutic approaches. Faist E (ed). Springer-Verlag 1996; 673-677

Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG. International Islet Transplant Registry Newsletter Nr. 8 2001; 1-20

Bretzel RG, Transplantation of the Pancreas and Pancreatic Islets, Textbook of Diabetes 1997; (2), 86.1-86.18

Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A. Klinische Inseltransplantation bei Diabetes Mellitus, Diab Stoffw 1993; 2: 278-290

Bretzel RG, Hering BJ, Stroedter D, Zekorn T, Federlin KF. Experimental Islet Transplantation in Small Animals. In: Ricordi C (ed), Pancreatic Islet Cell Transplantation 1992; 1 (24) 249- 260

Bretzel R, Ricordi C, Clinical islet transplantation, Diabetologia 1997; 40: (3), B45-B47

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986

Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR, McDaniel ML. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (5): 1731-1735

Davalli AM, Ogawa Y, Ricordi C, Sharp DW, Bonner-Weir S, Weir GC. A selective decrease in the beta-cell mass of human islets transplanted onto diabetic nude mice. *Transplantation* 1995; 59: 817-820

Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplant period: Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 1996; 45: 1161-67

Eckhardt T, Jahr H, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin impairs the engraftment of rat islets transplanted beneath the kidney capsule of C57Bl/6J mice. *J Mol Med* 1999; 77: 123-125

Eckhardt T. Tierexperimentelle Untersuchungen zum Engraftment transplantierter langerhansscher Inseln. Medizinische Dissertation. Eingereicht 2001, Universität Gießen

Federlin K, Bretzel RG. The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of the rat. *World J Surg* 1984; 8: 169-177

Fearon DT, Locksley RM. The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Science* 1996; 272: 50-54

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural Adjuvants: Endogenous Activators of Dendritic Cells. *Nature Medicine* 1999; 5: (11)1249-1255

Gotoh M, Maki T, Porter J, Monaco AP. Augmented survival of purified islet xeno-and allografts with reduced numbers. *Transplant Proc* 1987; 19: 984

Green, LC. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138

Gruner S, Volk HD, Falk CP, von Baer R. The influence of phagocytic stimuli on the expression of HLA-DR-Antigen; role of reactive oxygen intermediates. *Eur J Immunol* 1986; 16: 212-215



Halloran PF, Hornik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM. The „Injury Response“: A Concept Linking Nonspecific Injury, Acute Rejection, and Long Term Transplant Outcomes, *Transplant Proc* 1997; 29: 79-81

Hauner H, von Ferber L, Köster I. Prävalenz und ambulante Versorgung insulinbehandelter Diabetiker im Alter unter 40 Jahren. Eine Analyse von Krankenkassendaten der AOK Dortmund. *Diab Stoffw* 1996; 5: 101-106

Hering BJ, Brendel MD, Schultz A, Schultz B, Bretzel RG. International Islet Transplant Registry. *Newsletter* 1996; 1-20

Hering BJ, Ricordi C. Islet Transplantation for Patients with Type 1 Diabetes. *Graft* 1999; 1: (2) 12-27

Hirota T, Hirose H, Iwata H, Kanetake K, Murakawa S, Sasaki E, Takagi H, Bando M, Hamaoka T, Fujiwara H. Direct recognition of rat MHC antigens on rat antigen-presenting cells by mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and establishment of cell clones exhibiting a direct recognition pathway. *Transplantation* 1997; 63:705-710

Hoorens A, Stange G, Pavlovich D, Pipeleers D. Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 2001; 50: (3)551-557

Jaeger C, Hering BJ, Dryberg T, Federlin K, Bretzel RG. Islet Cell Antibodies and Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies in Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Undergoing Kidney and Islet-After-Kidney Transplantation. *Transplantation* 1996; 62: (3) 424-426

Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG. Progressive Islet Graft Failure Occurs Significantly Earlier in Autoantibody-Positive than in Autoantibody-Negative IDDM Recipients of Intrahepatic Islet Allografts. *Diabetes* 1997; 46: 1907-1910

Jahr H, Hußmann B, Teichert O, Eckhard T, Winter D, Bretzel RG. Akzeptanz Langerhansscher Inseln der Ratte nach Transplantation in nicht immunsupprimierte diabetische Mäuse, *Transplantationsmedizin* 1999a; 11: 196-198

Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med* 1999b; 77: 118-120

Kenyon NS, Fernandez LA, Lehmann R, Masetti M, Ranuncoli A, Chatzipetrou M, Iaria G, Dongmei H, Wagner JL, Ruiz P, Berho M, Inveradi L, Alejandro R, Mintz DH, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C. Long Term Survival and Function of Intrahepatic Islet Allografts in Baboons Treated With Humanized Anti-CD154. *Diabetes* 1999; 48: 1473-1481

Kolb H, Kolb-Bachofen V, Roep BO. Autoimmune versus Inflammatory Type I Diabetes: A Controversy?. *Immunol Today* 1995; 16: (4) 170-172

Kouwenhoven EA, de Bruin RWF, Bajema IM, Marquet RL, Ijzermans JNM. Prolonged Ischemia Enhances Acute Rejection in Rat Kidney Grafts. *Transplant Proc* 2001; 33: 361-362

Kupiec-Weglinsky JW, Hancock WW. Hyperacute and accelerated allograft rejection. *Transplant Biol* 1996; 45: 541

Lacy P. Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Rev* 1993, 1: (1) 76-92

Le J, Lin J, Henriksen-DeStefano D, Vilcek J. Bacterial Lipopolysaccharide-induced Interferon- $\gamma$  Production: Roles of Interleukin 1 and Interleukin 2. *J Immunol* 1986; 136: (12) 4525-4529

Linetsky E, Inverardi L, Kenyon NS, Alejandro R, Ricordi C. Endotoxin contamination of reagents used during isolation and purification of human pancreatic islets. *Transplant Proc* 1998; 30: 345-346

Luzi L, Perseghin G, Brendel MD, Terruzzi I, Battezzati A, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Friemann S, Socci C, Di Carlo V, Piceni Sereni L, Benedini S, Secchi A, Pozza G, Bretzel RG. Metabolic effects of restoring  $\beta$ -cell function after islet allotransplantation in type I diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: 277-82

Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology* 1994; 12:991-1045

Matzinger P. Graft tolerance, a duel of two signals. *Nature Medicine* 1999; 5: (6) 616-617

Meyer C, Hering BJ, Grossmann R, Brandhorst H, Brandhorst D, Gerich J, Federlin K, Bretzel RG. Improved glucose counterregulation and autonomic symptoms after intraportal islet transplants alone in patients with long-standing type I diabetes mellitus. *Transplantation* 1998; 66: 233-240

- Morris P. Transplantation: Past, Present and Future. *Diabetologia* 1997; 40: (3), B44-B45
- Nagata M, Mullen Y, Matsuo S, Herrera M, Clare-Salzler M. Destruction of Islet Isografts by Severe Nonspecific Inflammation. *Transpl Proc* 1990; 22 (2): 855-856
- Pabst M, Johnston RB. Increased Production of Superoxide Anion by Macrophages Exposed in Vitro to Muramyl Dipeptide or Lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1980; 151: 101-114
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: (9) 3197-3202
- Ricordi C, Lacy P, Finke EH. Automated method for the Isolation of Human Pancreatic Islets, *Diabetes* 1988, 37, 413-20
- Rietschel E, Kirikae T, Feist W, Loppnow H, Zabel P, Brade L, Ulmer AJ, Brade H, Seydel U, Zähringer U, Schlaak M, Flad D, Schade U. Molecular Aspects of the Chemistry and Biology of Endotoxin. 42. Colloquium Moosbach 1991; 207-231
- Ryan EA, Lakey RT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliot JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AMJ. Clinical Outcomes and Insulin Secretion after Islet Transplantation with the Edmonton Protocol, *Diabetes* 2001, 50: 710-719
- Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ, Latta PP, Hegre OD, Doherty EJ, Gentile FT, Flavin KS, Ansara MF, Lacy PE. Protection of Encapsulated Human Islets Implanted Without Immunosuppression in Patients with Type I or Type II Diabetes and in Nondiabetic Control Subjects. *Diabetes* 1994; 43: 1167-1170
- Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rayotte RV. Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343: 230-238
- Sicher SC, Chung GW, Vasquez MA, Lu CY. Augmentation or Inhibition of IFN- $\gamma$  Induced MHC Class II Expression by Lipopolysaccharides, *J Immunol* 1995; 5826-5834
- Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG. Evidence of Recurrent Autoimmunity in Human Allogeneic Islet Transplantation. *Transplantation* 1995; 61: (8) 1272- 1274

Sutherland DER, Pancreatic Transplantation, an Update. Diabetes Rev 1993; 1: 125-165

Sutherland DER, Kendall DM, Moudry KC, *et al.*, Pancreas transplantation in nonuremic type I diabetes recipients, Surgery, 1988; 104: 453-463

Tisch R, McDevitt H. Insulin Dependent Diabetes Mellitus. Cell 1996; 85: 291-297

Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Llamazares J, Pujoll-Borell R. Endotoxin activity of collagenase in human islet transplantation. Lancet 1997; 350: 641

Wacks JH, Kuehn F, Jahr H, Guette N, Wachlin G, Hahn HJ, Wolff H. Viability testing of isolated endocrine pancreatic tissue by a rapid colometric assay. Z Transplantationsmedizin 1992; 4: 20-23

Wahoff C, Papalois BE, Najaran JS, Kendall DM, Farney AC, Leone JP, Jessurun J, Dunn DL, Robertson RP, Sutherland DER. Autologous Islet Transplantation to Prevent Diabetes After Pancreatic Resection. Annals of Surgery 1995; 222: (4) 562-579

Warnock GL, Kneteman NM, Ryan E, Seelis REA, Rabinovitch A, Rajotte RV. Normoglycaemia after Transplantation of Freshly Isolated and Cryopreserved Pancreatic Islets in Type I Diabetes Mellitus. Diabetologia 1991; 34: 55-58

Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced Selective Priming Effects on Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Nitric Oxide Production on Mouse Peritoneal Macrophages. J Exp Med 1993; 177: 511-516

# Lebenslauf

Yvonne Sabrina Simonis

Geburtstag	15.09.1973
Geburtsort	Wiesbaden
Allgemeine Hochschulreife	7/1993 IGS Obere Aar, Taunusstein
<b>Hochschulstudium</b>	Beginn 4/1994 Justus-Liebig-Universität Giessen
Physikum	3/1995
1. Staatsexamen	3/1997
2. Staatsexamen	9/1999
Praktisches Jahr	5/2000 bis 5/2001
3. Staatsexamen	5/2001
<b>Promotionsarbeit</b>	1999-2001, Morphologisches Labor Medizinische Klinik III, JLU Giessen

# Vielen Dank

Vielen Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Henning Jahr für die Überlassung des Themas, stets präsente und fachkundige Betreuung und einen sehr langen Geduldsfaden. Seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft hat wesentlich zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard G. Bretzel möchte ich herzlich dafür danken, dass ich die personellen und apparativen Gegebenheiten seines Insellabors nutzen durfte, die Grundvoraussetzung für das Entstehen der vorliegenden Arbeit waren. Danke außerdem für die stets freundliche Unterstützung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Insellabors Frau Gudrun Pfeiffer, Frau Birte Hußmann und Frau Birgit Janczik danke ich für die freundschaftliche Aufnahme im Insellabor, eine außerordentlich gute Zeit und vor allem für all das, was mir beigebracht wurde. Ihnen und Daniel Winter und Torsten Eich danke ich zudem für das angenehme Arbeitsklima.

Danke den Mitarbeitern der Islet Transplant Registry für Antworten auf die vielen Fragen am Computer, besonders Markus Mann für seine kompetente und geduldige Hilfe mit dem Layout, und Barbara und Andreas Schultz für zahlreiche Hilfestellungen.

Ganz besonderen Dank an Jochen Wiegand für seine aufbauende seelisch-moralische Unterstützung. Er ließ mich das Ziel der Fertigstellung dieses Projektes nie aus den Augen verlieren und half mir mit Verständnis und Toleranz über zahlreiche Hürden.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium überhaupt ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, bin ich sehr verbunden.

Yvonne